LAPORAN

PENELITIAN PENGEMBANGAN IPTEKS (PPI)

PENELUSURAN POTENSI DAUN CAYRATIA TRIFOLIA YANG DIEKSTRAKSI SECARA SEKUENSIAL SEBAGAI KANDIDAT AGEN HEPATOPROTEKTOR ALAMI

Oleh;

Tuti Wiyati, M.Sc., Apt. (06.260486.01)

Ni Putu Ermi Hikmawanti, M.Farm. (03.090789.01)

FAKULTAS FARMASI DAN SAINS

PROGRAM STUDI FARMASI

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA

JAKARTA

TAHUN 2020

HALAMAN PENGESAHAN

PENELITIAN PENGEMBANGAN IPTEKS

Judul Penelitian	:	Penelusuran Potensi Daun *Cayratia trifolia* yang Diekstraksi secara Sekuensial sebagai Kandidat Agen Hepatoprotektor Alami
Skema Penelitian	:	Penelitian Pengembangan IPTEKS (PPI)
Ketua Peneliti	:	
a. Nama Lengkap	:	Apt. Tuti Wiyati, M.Sc.
b. NIDN	:	06.260486.01
c. Jabatan Fungsional	:	Asisten Ahli
d. Fakultas/Prodi	:	FFS/Farmasi
e. No. HP/Email	:	08111904454/tuti.wiyati@uhamka.ac.id
Anggota Peneliti	:	
a. Nama Lengkap	:	Ni Putu Ermi Hikmawan, M.Farm.
b. NIDN	:	03.090789.01
c. Fakultas/Prodi	:	FFS/Farmasi
Lama Penelitian	:	6 Bulan
Luaran Penelitian	:	Jurnal Nasional Terakreditasi Sinta 2
Jumlah Dana	:	Rp. 13.000.000

Jakarta, 14 Agustus 2020

Ketua Program Studi

Apt. Kori Yati, M.Farm.
NIDN. 03.240678.02

Peneliti

Apt. Tuti Wiyati, M.Sc.
NIDN. 06.260486.01

Menyetujui
Dekan FFS

Dr. Apt. Hadi Sunaryo, M.Si.
NIDN. 03.250672.01

SURAT KONTRAK

UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
Jln. Tanah Merdeka, Pasar Rebo, Jakarta Timur
Telp. 021-8416624, 87781809; Fax. 87781809

SURAT PERJANJIAN KONTRAK KERJA PENELITIAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA

Nomor : / F.03.07 / 2020
Tanggal : 12 Juni 2020

Bismillahirrahmanirrahim

Pada hari ini, Jum'at, tanggal Dua Belas, bulan Juni, Tahun Dua Ribu Dua Puluh, yang bertanda tangan di bawah ini **Prof. Dr. Hj Suswandari, M.Pd**, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, selanjutnya disebut sebagai PIHAK PERTAMA; **TUTI WIYATI M.SC., APT.**, selanjutnya disebut sebagai PIHAK KEDUA.

PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA sepakat untuk mengadakan Perjanjian Kontrak Kerja Penelitian yang didanai oleh RAPB Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

Pasal 1

PIHAK KEDUA akan melaksanakan kegiatan penelitian dengan judul : **PENELUSURAN POTENSI DAUN CAYRATIA TRIFOLIA YANG DIEKSTRAKSI SECARA SEKUENSIAL SEBAGAI KANDIDAT AGEN HEPATOPROTEKTOR ALAMI** dengan luaran wajib dan luaran tambahan sesuai data usulan penelitian Bacth 2 Tahun 2019 melalui simakip.uhamka.ac.id..

Pasal 2

Bukti luaran penelitian wajib dan tambahan harus sesuai sebagaimana yang dijanjikan dalam Pasal 1, Luaran penelitian yang dimaksud dilampirkan pada saat Monitoring Evaluasi dan laporan penelitian yang diunggah melalui simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 3

Kegiatan tersebut dalam Pasal 1 akan dilaksanakan oleh PIHAK KEDUA mulai tanggal 12 Juni 2020 dan selesai pada tanggal 12 November 2020.

Pasal 4

Berdasarkan kemampuan keuangan lembaga, PIHAK PERTAMA menyediakan dana sebesar Rp.13.000.000,- (Terbilang : *Tiga Belas Juta*) kepada PIHAK KEDUA untuk melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1. Sumber biaya yang dimaksud berasal dari RAB pada Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Tahun Anggaran 2019/2020.

Hak Cipta © http://simakip.uhamka.ac.id Tanggal Download: 12-06-2020

Pasal 5

Pembayaran dana tersebut dalam Pasal 4 akan dilakukan dalam 2 (dua) termin sebagai berikut;
(1) Termin I 70 % : Sebesar 9.100.000 (Terbilang: *Sembilan Juta Seratus Ribu Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA menyerahkan proposal penelitian yang telah direview dan diperbaiki sesuai saran reviewer pada kegiatan tersebut Pasal 1.

(2) Termin II 30 % : Sebesar 3.900.000 (Terbilang: *Tiga Juta Sembilan Ratus Ribu Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA mengunggah laporan akhir penelitian dengan melampirkan bukti luaran penelitian wajib dan tambahan sesuai Pasal 1 ke simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 6

(1) PIHAK KEDUA wajib melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1 dalam waktu yang ditentukan dalam Pasal 3.

(2) PIHAK PERTAMA akan melakukan monitoring dan evaluasi pelaksanaan kegiatan tersebut sebagaimana yang disebutkan dalam Pasal 1. Bila PIHAK KEDUA tidak mengikuti Monitoring dan Evaluasi sesuai dengan jadwal yang ditentukan, tidak bisa melanjutkan penyelesaian penelitian dan harus mengikuti proses Monitoring dan Evaluasi pada periode berikutnya.

(3) PIHAK PERTAMA akan mendenda PIHAK KEDUA setiap hari keterlambatan penyerahan laporan hasil kegiatan sebesar 0,5 % (setengah persen) maksimal 20% (dua puluh persen) dari jumlah dana tersebut dalam Pasal 4.

(4) Dana Penelitian dikenakan Pajak Pertambahan Nilai (PPN) dari keseluruhan dana yang diterima oleh PIHAK PERTAMA sebesar 5 % (lima persen)

Jakarta, 12 Juni 2020

PIHAK PERTAMA Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Ketua,	PIHAK KEDUA Peneliti,
Prof. Dr. Hj Suswandari, M.Pd	**TUTI WIYATI M.SC., APT.**

Mengetahui
Wakil Rektor II UHAMKA

Dr. ZAMAH SARI M.Ag.

Hak Cipta © http://simakip.uhamka.ac.id Tanggal Download: 12-06-2020

ABSTRAK

Hati merupakan organ terbesar dalam tubuh yang memiliki peran penting dalam metabolisme sel tubuh. Apabila hati mengalami gangguan maka tidak dapat melaksanakan fungsinya. Gangguan atau kelainan fungsi hati disebut kerusakan hati. Kerusakan hati dapat dipicu salah satunya oleh senyawa kimia yang bersifat hepatotoksik. Terapi yang dapat dilakukan untuk mencegah kerusakan hati salah satunya adalah dengan memberikan hepatoprotektor. Daun galing (Cayratia trifolia L. Domin) mengandung senyawa antioksidan yaitu fenolik dan flavonoid yang diduga berkhasiat sebagai hepatoprotektor. Kandungan senyawa antioksidan lain yang juga terkandung dalam daun galing yaitu stilben (resveratrol, viniferin, ampelopsin) dan flavonoid sianidin. Senyawa antioksidan umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, etil asetat, maupun air. Perolehan kandungan senyawa kimia pada tanaman untuk dapat memberikan aktivitas farmakologi salah satunya sangat dipengaruhi oleh pemilihan pelarut selama proses ekstraksinya. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak sekuensial daun galing yang kaya akan senyawa antioksidan sebagai hepatoprotektor alami. Ekstraksi daun galing dilakukan dengan cara maserasi secara bertingkat (sekuensial) menggunakan n-heksana, etil asetat dan etanol 70%. Ekstrak ditentukan karakteristiknya meliputi organoleptis, rendemen, kadar air, kadar abu, skrining fitokimia, penentuan kadar fenolik dan flavonoid serta pola senyawa flavonoid menggunakan KLT. Penelitian ini didesain menggunakan rancangan acak lengkap dengan menggunakan 5 kelompok tikus, yaitu kelompok kontrol normal (tanpa induksi dan perlakuan), kelompok kontrol negatif (tanpa perlakuan), kelompok kontrol positif (memperoleh Legalon yang mengandung Sylimarin), kelompok ekstrak etil asetat serta kelompok ekstrak etanol 70%. Ekstrak masing-masing diberikan dengan dosis 200 mg/KgBB selama 7 hari secara oral. Bahan penginduksi kerusakan hati menggunakan nitrobenzene. Parameter aktivitas farmakologi yang diukur antara lain kadar ALT, AST, ALP, bilirubin, MDA dan gambaran histipatologi hati tikus. Hasil menunjukkan semua perlakuan mampu menurunkan kadar ALP, menurunan kadar AST dan ALT, kadar Bilirubin total dan direct serta menurunkan kadar MDA.

Kata kunci: *Cayratia trifolia* L. Domin. Daun galing-galing, Hepatoprotektor.

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Pengesahan	ii
Surat Kontrak	iii
Abstrak	v
Daftar Isi	vi
Daftar Tabel	vii
Daftar Gambar	viii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. KAJIAN PUSTAKA	3
BAB 3. METODE PENELITIAN	6
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	8
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	27
BAB 6. DAFTAR PUSTAKA	28

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Galing 8

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak 9

Tabel 3. Hasil Uji Kadar Abu dan Kadar Air 9

Tabel 4. Hasil Penapisan Fitokimia 10

Tabel 5. Hasil Kadar Fenol Total Ekstrak Daun Galing 12

Tabel 6. Hasil Penetapan Flavonoid Total 13

Tabel 7. Bercak yang tampak dalam pereaksi sitroborat 15

Tabel 8. Bercak yang tampak dalam pereaksi uap amonia 15

Tabel 9. Rerata Hasil AkhirPengukuran Kadar ALP 17

Tabel 10. Kadar AST dan ALT Setelah Induksi Nitrobenzen 18

Tabel 11. Hasil Pengukuran Rata-Rata Kadar AST dan ALT 19

Tabel 12. Kadar Rerata Awal Bilirubin Direct dan Bilirubin Total Setelah Induksi Nitrobenzen 21

Tabel 13. Kadar Rerata Akhir Bilirubin Direct dan Bilirubin Total Setelah Induksi Nitrobenzen 21

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Roadmap Penelitian 5
Gambar 2. Diagram Alir Prosedur Penelitian 7
Gambar 3. Kurva Kalibrasi Fenol Total 12
Gambar 4. Grafik kurva kalibrasi Kuersetin 13
Gambar 5. Kurva Kalibrasi TEP 23
Gambar 6. Hasil Kadar MDA Organ Hati 24
Gambar 7. Gambaran Histopatologi Hati 25

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit hati merupakan masalah kesehatan dunia bahkan lebih dari 350 juta jiwa penduduk dunia menderita hepatitis kronik (Park et al. 2010). Data Riset Kesehatan Dasar menunjukkan prevalensi penyakit hati secara nasional naik dari 25,8% menjadi 34,1% (Kemenkes RI 2018). Penyebab kerusakan hati salah satunya adalah paparan bahan kimia (Guru Kumar et al. 2011). Nitrobenzen (C6H5NO2) adalah suatu bahan organik senyawa radikal yang mampu menyebabkan hepatic centrolobular necrosis. Nitrobenzen menyebabkan toksisitas pada berbagai organ yaitu anemia hemolitik, kemacetan limfa dan hati, sumsum tulang dan limfa hematopoises. Paparan kronis nitrobenzene juga dapat menimbulkan pengembangan anemia hemolitik dan hepatitis toksik (PHE 2018).

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan sumber daya alam hayati tanaman obat (Wasito 2011). Galing merupakan salah satu tumbuhan liar yang banyak terdapat di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Hampir seluruh bagian dari tumbuhan ini dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional yang berkhasiat sebagai antidiabetik, hepatoprotektor, menurunkan kadar kolesterol dalam darah, meningkatkan kekebalan tubuh, antioksidan, antivirus, antibakteri dan antikanker (Kumar et al. 2012). Daun galing (Cayratia trifolia L. Domin) mengandung senyawa antioksidan yang diduga berkhasiat sebagai hepatoprotektor, yaitu fenolik dan flavonoid. Kandungan senyawa antioksidan lain yang juga terkandung dalam daun galing yaitu stilben (resveratrol, viniferin, ampelopsin) dan flavonoid sianidin (Homhual et al. 2014).

Senyawa antioksidan umumnya larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, etil asetat, maupun air. Fraksi polar metanol daun galing memiliki daya antioksidan yang paling aktif terhadap DPPH dengan nilai IC sebesar 125,7 ppm dan kadar fenol total sebesar 43,3 μg/mL sedangkan fraksi kloroform memiliki nilai IC sebesar 129,5 ppm dan kadar fenol total sebesar 39,3 μg/mL sehingga berpotensi memiliki aktivitas yang tidak jauh berbeda. Fraksi polar daun galing telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Rumayati dkk 2014). Kumar et al.

(2011) telah membuktikan bahwa ekstrak etanol tanaman galing dengan dosis 200 mg/kgBB mampu melindungi dan mengembalikan fungsi hati tikus yang sebelumnya diinduksi nitrobenzen. Dengan melihat perkembangan penelitian terdahulu maka perlu penelitian lebih lanjut untuk melihat daya aktivitas hepatoprotektor daun galing secara ektraksi sekuensial dengan parameter kadar ALT, AST, ALP, bilirubin, MDA dan gambaran histopatologi hati tikus sehingga didapat data akurasi yang lebih baik untuk pengembangan obat herbal kedepannya.

Pengembangan daun galing sebagai obat herbal harus disertai dengan pembuatan ekstrak dengan mutu dan kualitas yang baik untuk tujuan memperoleh khasiat yang maksimal. Dengan demikian, penting untuk dilakukannya penelusuran potensi daun galing yang diekstraksi secara sekuensial untuk memperoleh ekstrak yang mengandung kelompok metabolit dengan kepolaran tertentu dengan kualitas baik sehingga mampu memberikan efektifitas yang optimal. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar pengembangan daun galing menjadi suatu kandidat produk herbal terstandar dengan khasiat hepatoprotektor alami.

B. Permasalahan penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, alasan pemilihan ekstrak etil asetat dan etanol 70% adalah karena kedua ekstrak tersebut memiliki aktivitas antioksidan dan kadar total fenol yang tidak jauh berbeda. Adapun masalah yang diangkat dalam penelitian ini adalah apakah ekstrak etil asetat dan etanol 70% daun galing memiliki aktivitas sebagai hepatoprotektor pada tikus putih jantan yang diinduksi nitrobenzene yang dilihat dari parameter kadar ALT, AST, ALP, bilirubin, MDA dan gambaran histipatologi hati tikus?

C. Tujuan penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya aktivitas hepatoprotektor ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% daun galing terhadap kadar ALT, AST, ALP, bilirubin, MDA dan melihat gambaran histipatologi hati tikus.

BAB 2. KAJIAN PUSTAKA

A. State of the Art

Penyakit hati merupakan masalah kesehatan dunia bahkan lebih dari 350 juta jiwa penduduk dunia menderita hepatitis kronik (Park et al. 2010). Penyakit hati umumnya disebabkan oleh bahan kimia beracun (antibiotik tertentu, kemoterapi, aflatoksin), menkonsumsi alkohol, infeksi dan kelainan autoimun (Kumar et al. 2011). Salah satu senyawa kimia yang dapat menyebabkan kerusakan hati yaitu nitrobenzen (C6H5NO2). Nitrobenzene adalah cairan yang mudah menguap yang dapat dengan mudah memperoleh akses ke tubuh melalui inhalasi, penetrasi kulit dari uap dan penyerapan kulit dari cairan tersebut. Kumar et al. (2011) melaporkan penggunaan nitrobenzena sebagai induksi dalam pengujian hepatoprotektor tanaman galing sebanyak 50 mg/kgBB, dimana dosis tersebut menunjukan efek hepatotoksik pada hewan coba. Beberapa parameter kerusakan organ hati yang bisa diukur pada hewan coba antara lain kadar ALT, AST, ALP, bilirubin, MDA (Kumar et al. 2011).

Aspartate Aminotranferase (AST atau SGOT) dan Alanine Aminotranferase (ALT atau SGPT) merupakan enzim yang dijadikan indikator yang sensitif terhadap adanya kerusakan sel hati. AST adalah enzim yang terdapat dalam sel jantung, hati, otot skeletal, ginjal, otak, pankreas, limpa, dan paru. Enzim ini akan dikeluarkan ke sirkulasi apabila terjadi kerusakan atau kematian sel. ALT biasanya meningkat lebih tinggi dari AST pada obstruksi saluran empedu ekstra hepatik akut. Jika didapatkan peningkatan >1000 U/L, kemungkinan terdapat penyakit hepatitis virus, iskemik hati atau kerusakan hati karena toksin atau obat (Sulaiman dkk. 2012).

Bilirubin merupakan hasil akhir dari katabolisme eritrosit yang prosesnya terjadi di hati. Peningkatan kadar bilirubin terkonjugasi lebih sering terjadi akibat peningkatan pemecahan eritrosit, sedangkan peningkatan bilirubin tidak terkonjugasi lebih cenderung akibat disfungsi atau gangguan fungsi hati. Nilai normal total ≤ 1.4 mg/dL, langsung ≤ 0.40 mg/dL (Kemenkes RI 2011). Fahrudin (2015) melaporkan bahwa senyawa fenol juga berpotensi sebagai hepatoprotektor karena mampu menurunkan kadar enzim hepar didalam darah. MDA merupakan

indikator kerusakan hati dan salah satu senyawa produk oksidasi lipid dalam tubuh yang digunakan sebagai indikator terjadinya proses oksidasi lipid akibat radikal bebas (Momuat et al. 2011). Parameter kerusakan hati yang lainnya adalah alkaline phospatase (ALP), ALP merupakan enzim yang berasal dari jaringan, tulang, hati dan plasenta terutama berasal dari hati. Enzim ini disebut alkaline karena bekerja baik pada pH 9 (Sulaiman dkk. 2012).

Sampai saat ini, belum ada obat yang disetujui sebagai hepatoprotektor. Hepatoprotektor adalah suatu istilah yang diberikan pada obat atau obat herbal yang dapat melindungi hati atau memulihkan hati (Mu'nim 2011). Salah satu obat herbal yang sudah dipercaya sebagai agen heaptoprotektor adalah Silymarin. Cara kerja Silymarin sebagai hepatoprotektor yaitu menurunkan pembesaran hati dengan menghambat siklus 5-lipoksigenase dan menghambat produksi leukotrien dan radikal bebas pada sel Kuppfer hati. Selain itu, silymarin pada sel hepatosit dapat menghambat produksi lipid peroksidase dan kerusakan sel (Loguercio 2011).

Indonesia merupakan salah satu negara yang kaya akan sumber daya alam hayati dan salah satu keanekaragaman hayati adalah tanaman obat (Wasito 2011). Salah satu keanekaragaman hayati yang perlu dimanfaatkan adalah tumbuhan (Cayratia trifolia (L.) Domin), yang juga dikenal dengan nama Galing. Galing merupakan salah satu tumbuhan liar yang banyak terdapat di Asia Tenggara, termasuk Indonesia. Galing merupakan tumbuhan yang termasuk ke dalam keluarga Vitaceae dan biasanya tumbuh dihabitat terestrial (hutan tropis primer, hutan hujan sekunder, hutan pesisir) dengan kondisi terbuka dan terpapar sinar matahari. Galing adalah tumbuhan herba merambat dan memanjat dengan menggunakan sulurnya untuk tumbuh lebih tinggi (Feriadi dkk. 2018). Hampir seluruh bagian dari tumbuhan ini dapat dimanfaatkan sebagai obat tradisional yang berkhasiat sebagai antidiabetik, hepatoprotektor, menurunkan kadar kolesterol dalam darah, meningkatkan kekebalan tubuh, antioksidan, antivirus, antibakteri dan antikanker (Kumar et al. 2012). Seluruh bagian galing dilaporkan memiliki metabolit sekunder alkaloid, steroid, terpenoid, flavonoid, dan tannin (Kumar et al. 2012) daunnya mengandung stilben (resveratrol, piceid, viniferin, ampelopsin) dan flavonoid sianidin (Roat et al. 2017).

Kumar dkk. (2011) melaporkan, ekstrak etanol daun galing dengan dosis 200 mg/kg BB yang diberikan selama 7 hari mampu melindungi kerusakan hati pada tikus yang diinduksi oleh nitrobenzen. Hasil penelitian uji aktivitas antioksidan secara invitro yang dilakukan Rumayati dkk. (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanol daun galing memiliki kandungan total fenol 43 µg/mL. Ekstrak metanol tersebut memiliki aktivitas antioksidan terhadap DPPH dengan nilai IC50 sebesar 125,7 ppm. Pengembangan daun galing sebagai agen hepatoprotektor harus disertai dengan pembuatan ekstrak dengan mutu dan kualitas yang baik untuk tujuan memperoleh khasiat yang maksimal. Dengan demikian, penting untuk dilakukannya penelusuran potensi daun galing yang diekstraksi secara sekuensial untuk memperoleh ekstrak yang mengandung kelompok metabolit dengan kepolaran tertentu dengan kualitas baik sehingga mampu memberikan efektifitas yang optimal.

B. Roadmap Penelitian

Gambar 1. Roadmap Penelitian

BAB 3. METODE PENELITIAN

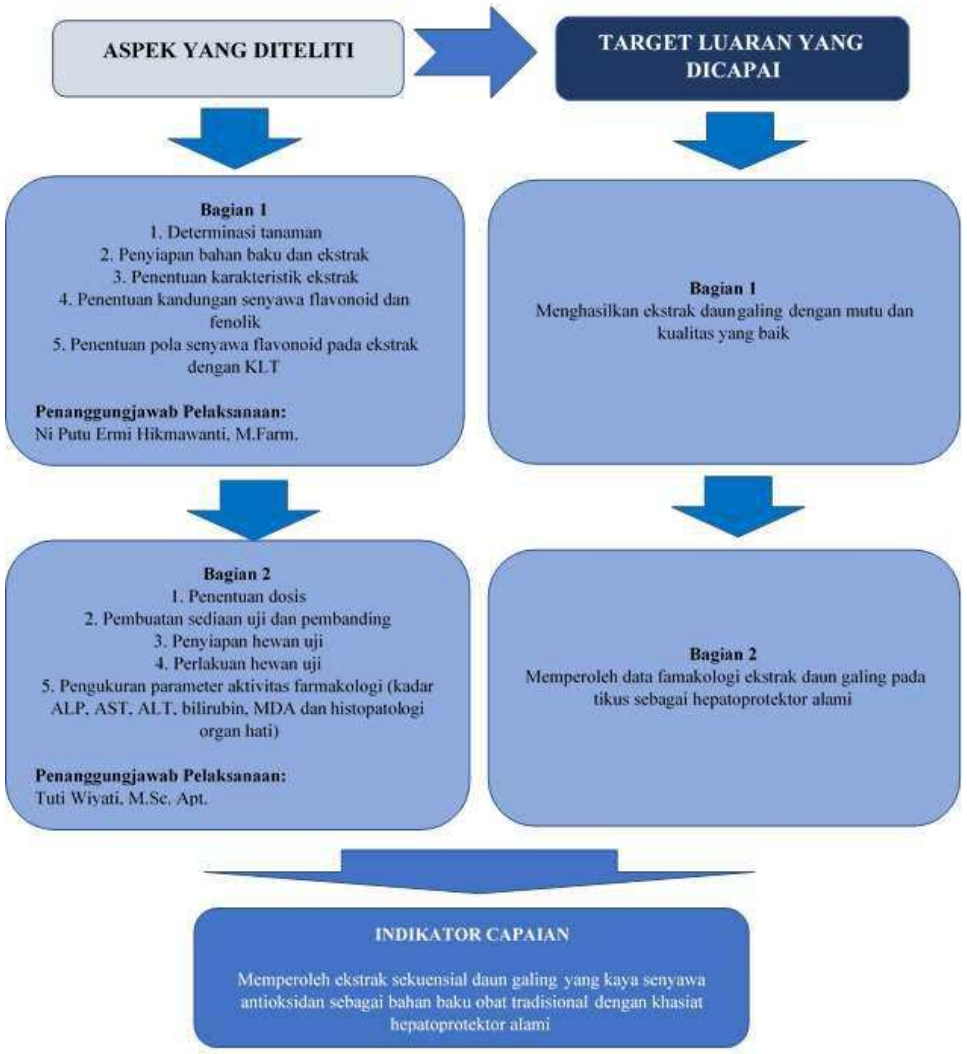
A. Pola Penelitian

Pola pada penelitian ini meliputi:

1. Determinasi tanaman yang dilakukan di Balai Penelitian dan Pengembangan Botani "Herbarium Bogoriense" LIPI, Kebun Raya Bogor.
2. Penyiapan bahan baku daun galing: pengumpulan bahan yang diperoleh dari Tuban, Jawa Timur dan pembuatan serbuk simplisia daun galing.
3. Pembuatan ekstrak sekuensial (ekstrak etil asetat dan etanol 70%) daun galing dengan menggunakan metode maserasi
4. Pemeriksaan karakteristik mutu ekstrak, meliputi perhitungan rendemen, organoleptik, kadar air, kadar abu, dan skrining fitokimia (identifikasi keberadaan alkaloid, flavonoid, fenolik, steroid, terpenoid, saponin, dan tanin).
5. Penentuan pola senyawa flavonoid pada ekstrak sekuensial menggunakan metode KLT dengan fase diam adalah plat silika gel GF254. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform:aseton:asam formiat (10:2:1). Sistem visualisasi menggunakan sinar UV 254 dan 365 nm serta pereaksi deteksi sitroborat dan uap ammonia.
6. Penentuan kadar fenolik ekstrak menggunakan baku pembanding asam galat dan pereaksi Folin-Ciocalteu yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal sekitar 600-800 nm.
7. Penentuan kadar flavonoid ekstrak menggunakan baku pembanding kuersetin dan pereaksi AlCl3. Absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal sekitar 400-600 nm.
8. Penentuan dosis dan pembuatan larutan uji dan pembanding (Legalon yang mengandung Sylimarin dengan dosis 7,20 mg/250 gBB tikus).
9. Persiapan hewan coba meliputi: aklimatisasi dan pengelompokan hewan coba
10. Perlakukan hewan coba meliputi: induksi nitrobenzene dengan dosis 50 mg/kgBB kecuali kelompok normal serta treatment hewan coba pada tiap kelompok uji menggunakan 1 dosis ekstrak yaitu 200 mg/kgB. Lama waktu treatment adalah 7 hari.

11. Penentuan kadar AST dan ALT serum darah tikus.
12. Penentuan kadar ALP pada serum darah tikus.
13. Penentuan kadar bilirubin pada serum darah tikus.
14. Penentuan aktivitas antioksidan in vivo dengan mengukur kadar MDA pada darah tikus menggunakan spektrofotometer.
15. Pembuatan preparat dan pengamatan histopatologi organ hati menggunakan mikroskop.
16. Pengumpulan dan analisis data.

B. Diagram Alir Penelitian



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Daun Galing

Determinasi tanaman dilakukan di Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya – LIPI kebun raya Bogor. Hal ini bertujuan untuk mengetahui keaslian dan kebenaran jenis tanaman yang akan digunakan, dengan demikian kesalahan dalam pengumpulan bahan baku yang akan diteliti dapat terhindarkan. Berdasarkan surat yang diterbitkan LIPI nomor B-2883/IPH.3/KS/ VII/2019Hasil determinasi menunjukan bahwa benar tanaman yang digunakan merupakan daun Galing (*Cayratia trifolia* (L). Domin).

B. Hasil Ekstraksi Daun Galing

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Galing

No.	Jenis	Hasil
1	Daun galing segar	10,0 kg
2	Serbuk daun galing	1,5 kg
3	Ekstrak etil asetat daun galing	26 g
4	Ekstrak etanol 70% daun galing	319,5 g
5	Rendemen ekstrak etil asetat	1,73%
6	Rendemen ekstrak etanol 70%	21,30%

Daun galing segar diperoleh dari wilayah Tuban, Jawa Timur. Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak dan tidak ditumbuhi jamur dalam penyimpanan jangka lama, menghemat tempat penyimpanan, serta menghentikan proses enzimatik sehingga metabolisme golongan senyawa yang ada dalam daun galing dapat dihentikan (Nuria dkk. 2009). Tujuan pembuatan serbuk adalah untuk memperbesar luas permukaan sehingga mempercepat proses ekstraksi karena dengan memperbesar luas permukaan akan memperbesar kontak antara serbuk dan pelarut semakin besar (Sa'adah dkk. 2015).

Serbuk daun galing kemudian diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Maserasi dipilih karena cara pengerjaan dan peralatan yang relatif sederhana, mudah dan menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan. Maserasi bertingkat dimulai dari menggunakan pelarut non polar-semi polar-polar yaitu menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat, etanol 70%. Tujuan menggunakan pelarut yang bersifat non polar (*n*-heksan) terlebih dahulu untuk menarik senyawa yang bersifat non-

polar begitupun dengan pelarut semi polar (etil asetat) untuk menarik senyawa semi polar, sehingga dengan mudah pelarut polar (etanol 70%) akan menarik senyawa polar akan lebih maksimal tanpa adanya gangguan senyawa dari golongan kepolaran yang berbeda (Permadi 2015). Rumayati (2014) menyebutkan hubungan antioksidan dengan kandungan total fenol fraksi *n*-heksan, kloroform dan metanol daun galing berturut-turut memiliki nilai IC_{50} sebesar 592,1, 129,5 dan 125,7. Tingkat kekuatan antioksidan pada range 100-250 menurut Jun (2003) termasuk dalam golongan sedang sedangkan range 250-500 termasuk kedalam golongan lemah. Berdasarkan hasil uji didapat hasil rendemen ekstrak etil asetat sebesar 1,73% dan rendemen ekstrak etanol 70% sebesar 21,30% (Tabel 1).

C. Hasil Karakteristik Ekstrak Daun Galing

Uji Organoleptik dilakukan untuk mengetahui karakteristik dari serbuk dan ekstrak daun galing meliputi bentuk, bau, rasa, dan warna. Hasil uji organoleptik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik Ekstrak

Jenis	Parameter			
	Bentuk	Bau	Rasa	Warna
Serbuk	Kering	Khas	Pahit	Hijau
Ekstrak Etil asetat	Kental	Khas	Pahit	Hijau
Ekstrak Etanol 70%	Serbuk	Khas	Pahit	Coklat

Tabel 3. Hasil Uji Kadar Abu dan Kadar Air

Sampel	Parameter	
	Kadar Abu	Kadar Air
Ekstrak Etil Asetat	0,955 %	4,56 %
Ekstrak Etanol 70 %	6,985 %	12,77 %

Pengujian kadar abu dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral internal dan eksternal yang berasal dari proses awal sampai terbentuknya ekstrak. Kadar abu berkaitan dengan mineral, baik senyawa organik seperti protein, lemak, karbohidrat maupun anorganik seperti air dan garam yang diperoleh secara internal maupun eksternal (Depkes RI 2000). Hasil kadar abu menunjukkan ekstrak ekstrak eil asetat sebsar 0,955% dan etanol 70% sebesar 6,986% (Tabel 3).

Pengujian kadar air dilakukan dengan tujuan untuk memberikan batasan maksimal kandungan air di dalam simplisia, karena dengan jumlah kandungan air yang tinggi dapat menyebabkan simplisia mudah ditumbuhi media jamur dan bakteri sehingga dapat merusak kandungan senyawa di dalam simplisia (DepKes RI 2000). Menurut DepKes (1995) kadar air ekstrak kental memiliki range 5-30%. Dari Tabel 3 diketahui bahwa konsistensi ekstrak berdasarkan parameter kadar airnya masuk kriteria ekstrak kental yang baik. Namun nilai kadar air > 10% berpotensi lebih mudah terkontaminasi. Tingginya kadar air dapat disebabkan absorpsi air ke dalam ekstrak saat proses penyimpanan akibat lingkungan yang lembab (Saifudin *et al*. 2011). Agar ekstrak tidak mudah terkontaminasi dan mudah ditumbuhi bakteri maka disimpan dalam desikator yang berisikan silika gel agar tidak.

D. Hasil Penapisan Fitokimia Daun Galing

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalam ekstrak daun galing. Hasil penapisan fitokimia daun galing dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 4. Hasil Penapisan Fitokimia

Uji Penapisan	Ekstrak Etil	Ekstrak Etanol
Alkaloid	+	+
Flavonoid	+	+
Saponin	-	-
Fenolik	+	+
Tanin	-	+
Steroid	+	-

Keterangan : (+) = terdeteksi
(-) = tidak terdeteksi

Dari Tabel 4 diperoleh alkaloid, flavanodi, fenolik dan steroid positif. Alkaloid yang terbentuk dari endapan karena penggantian lignan. Atom hidrogen yang memiliki pasangan elektron bebas pada alkaloid mengganti ion iod dalam pereaksi Dragendorff dan Mayer. Alkaloid positif ditunjukkan dengan endapan putih oleh pereaksi Mayer, endapan merah jingga oleh pereaksi Dragendorff dan endapan coklat oleh pereaksi Bouchardat. Senyawa flavonoid yang ada sehingga menimbulkan reaksi warna merah yang merupakan ciri adanya flavonoid (Robinson 1995). Pada pengujian fenolik, pereaksi $FeCl_3$ digunakan untuk mengidentifikasi

senyawa fenol/polifenol. Penambahan $FeCl_3$ akan menimbulkan warna biru tua, biru kehitaman, atau warna hitam kehijauan.

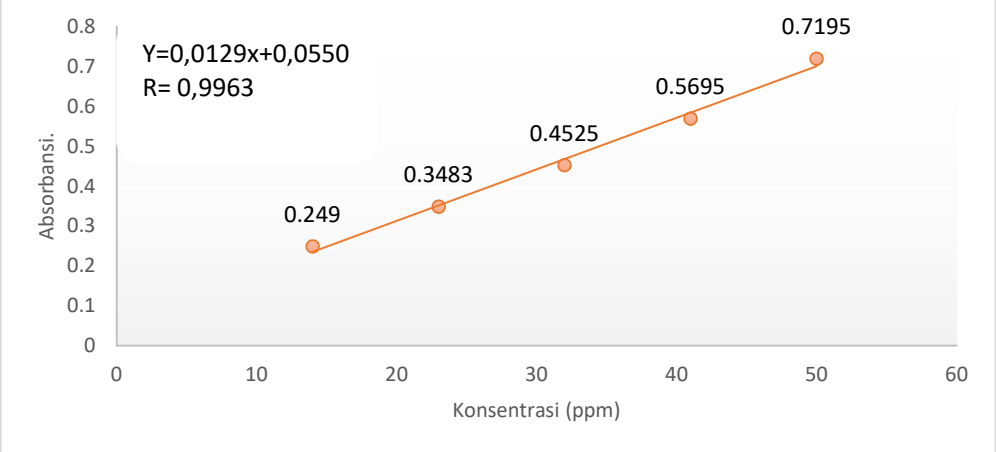
Hasil penelitian ini juga sejalan dengan Kumar *et al.* (2012) yang menyatakan bahwa hasil dari skrining fitokimia ekstrak daun *Cayratia trifolia* didapat hasil positif mengandung senyawa flavonoid, tanin, steroid, dan hasil negatif pada uji saponin. Sedangkan hasil skrining pada tanin ekstrak etil tidak terdeteksi, dan steroid ekstrak etanol juga tidak terdeteksi.

E. Hasil Penentuan Kadar Fenol Total

Senyawa fenol terdiri dari beraneka ragam struktur dengan ciri khas berupa cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenol memiliki beberapa sifat antara lain: mudah larut dalam air sehingga senyawanya bersifat polar, cepat membentuk kompleks dengan protein dan sangat peka terhadap oksidasi enzim (Rondang dkk. 2017). Tanaman galing diketahui memiliki metabolit sekunder seperti flavonoid dan fenolik. Daunnya mengandung senyawa diantaranya stilben, reveratrol, piceid, viniferin, dan ampelopsin (Kumar *et al.* 2012).

Ampelopsin dan viniferin merupakan dimer atau senyawa kimia yang terdiri dari dua molekul yang identik dengan stilben, senyawa tersebut memiliki aktivitas biologi salah satunya anti hepatotoksik. Sedangkan senyawa stilben merupakan senyawa polifenol yang memiliki efek antioksidan, senyawa tersebut diduga yang berperan dalam mengurangi radikal bebas dan memiliki aktivitas antioksidan. Uji kandungan fenol total bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terdapat dalam sampel. Uji kandungan fenol total dilakukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Reaksi yang terjadi adalah reaksi reduksi-oksidasi. Senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat dalam Folin-Ciocalteu membentuk molibdenum yang berwarna biru (Tursiman dkk. 2012). Adapun reaksi reagen Folin-Ciocalteu dengan senyawa fenol dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan hasil dari spektrofotometer Uv-vis didapat hasil panjang gelombang yaitu 743,50 nm dengan absorbansi sebesar 0,455, kemudian dilakukan operating time dan didapat senyawa akan stabil dengan pelarutnya setelah 30 menit, kemudian dilakukan pembuatan kurva kalibrasi asam galat sebagai pembanding yang digunakan pada pembacaan fenol total.



Gambar 3. Kurva Kalibrasi Fenol Total

Pembuatan kurva kalibrasi berguna untuk menentukan kadar fenol total dalam sampel melalui persamaan regresi dari kurva kalibrasi. Penentuan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan metode pembanding asam galat yaitu GAE (*Gallic Acid Ekivalen*) dimana dalam 1 g ekstrak dibandingkan dengan jumlah berapa banyak mg asam galat yang didapat dari hasil pembacaan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

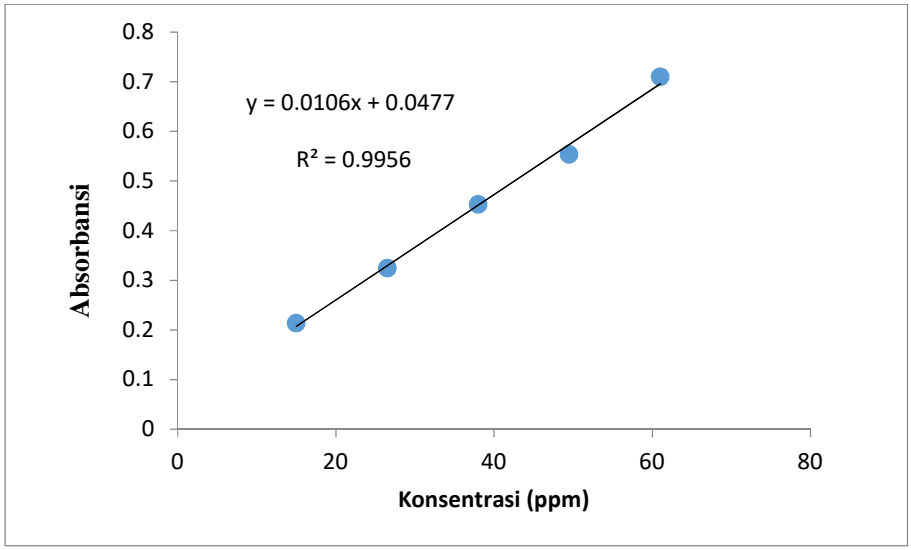
Tabel 5. Hasil Kadar Fenol Total Ekstrak Daun Galing

Jenis Ekstrak	Kadar Fenol Total (mgGAE/g sampel)±SD
Etil Asetat	18,2831 ± 0,141
Etanol 70%	23,8707 ± 0,191

Berdasarkan hasil Tabel 5 menunjukan bahwa senyawa fenolik lebih banyak terekstrak pada ekstrak etanol daripada ekstrak etil asetat. Hal ini dikarenakan sifat fenol yang mudah larut dalam air sehingga senyawanya bersifat polar (Rondang dkk. 2017).

Senyawa fenol menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya dan membentuk radikal yang stabil. Terbentuknya radikal stabil ini dikarenakan elektron bebas yang terdapat pada radikal distabilkan oleh delokalisasi elektron dengan adanya resonansi pada cincin aromatik (Tursiman dkk. 2012).

F. Penetapan Flavonoid total



Gambar 4. Grafik kurva kalibrasi Kuersetin

Kadar flavonoid total ditentukan dengan kurva standar kuersetin pada beberapa konsentrasi yaitu 15; 26,5; 38; 49,5 dan 61 ppm. Penentuan kadar flavonoid total dengan metode alumunium klorida. Prinsip penetapan kadar flavonoid metode alumunium klorida dimana flavon dan flavonol memiliki gugus hidroksil, dengan pereaksi alumunium klorida akan terjadi pembentukan kompleks antara alumunium klorida dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang stabil terhadap asam. Penggunaan kuersetin sebagai pembanding karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga dan penambahan Natrium asetat guna mendeteksi gugus hidroksil C-7 pada flavon dan flavonol (Hanani 2015).

Tabel 6. Hasil Penetapan Flavonoid Total

Jenis Ekstrak	Rerata kandungan flavonoid (mgQE/g ekstrak) ± SD
Ekstrak Etil Asetat	17,9825 ± 0,8939
Ekstrak Etanol 70 %	27,9528±0,61866

Hasil dari regresi linier kurva kalibrasi kuersetin kemudian digunakan untuk menentukan kadar flavonoid total pada ekstrak etil asetat dan etanol 70% daun galing yang didapat dari hasil pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis. Dari penetapan kadar flavonoid total diperoleh Dari hasil tersebut pada ekstrak etanol

70% memiliki kadar flavonoid yang lebih besar dibandingkan ekstrak etil asetat (Tabel 6).

G. Hasil Indentifikasi Senyawa Flavonoid Dengan Metode KLT

Pemisahan senyawa flavonoid daun galing dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT). KLT merupakan suatu metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel yang bersifat polar. Silika gel GF254 digunakan sebagai fase diam karena merupakan fase diam yang sering digunakan dan pemisahannya dapat diatur dengan penggunaan pelarut pengelusi berdasarkan jenis senyawa yang ingin dielusi. Silika gel GF254 mengandung indikator flourosensi yang ditambahkan untuk membantu penampakkan bercak tak warna pada plat yang telah dikembangkan (Gritter 1991). Plat KLT silika gel GF254 diaktifasi dengan cara dioven pada suhu 105^{o}C selama 30 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada plat KLT sehingga daya serap plat menjadi maksimal (Sastrohamidjojo 2007).

Eluen yang digunakan sebagai fase gerak untuk mengidentifikasi flavonoid pada tanaman galing dilakukan orientasi terlebih dahulu untuk menentukan komposisi fase gerak yang paling optimal. Hasil orientasi menunjukan bahwa komposisi fase gerak yang paling optimal adalah kloroform: aseton: asam format (10:2:1). Analisa KLT juga menggunakan kuersetin sebagai pembanding.

Bejana yang digunakan terlebih dahulu dijenuhkan supaya seluruh permukaan bejana terisi uap eluen sehingga rambatan yang dihasilkan baik dan beraturan. Penjenuhan dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh homogenitas dalam bejana dan meminimalkan peguapan pelarut dari lempeng KLT (Kusnadi 2017).

Setelah jenuh dilakukan penotolan sampel pada plat KLT dimasukkan kedalam bejana yang berisi fase gerak yang sudah jenuh, dilihat sampai tanda batas atas plat dan deteksi senyawa yang diidentifikasi dibawah sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Panjang gelombang 254 nm untuk melihat bercak pada plat KLT sedangkan UV pada panjang gelombang 366 nm digunakan untuk melihat warna atau bercak yang tidak terlihat pada panjang gelombang 254 nm (Kusnadi 2017).

Tabel 7. Bercak yang tampak dalam pereaksi sitroborat

Sampel	Rf	Sinar tampak	Sebelum semprot		Semprot sitroborat	
			UV 254	UV 366	UV 254	UV 366
Kuersetin	0,62	Coklat	pemadaman	Hijau kekuningan	Pemadaman	Hijau kekuningan
Ekstrak Etanol 70%	0,6	Coklat	pemadaman	Biru hijau	Pemadaman	Biru hijau
Ekstrak Etil Asetat	0,72	-	pemadaman	Orange, merah muda	Pemadaman	Orange, merah muda

Tabel 8. Bercak yang tampak dalam pereaksi uap amonia

Sampel	Rf	Sinar tampak	Sebelum semprot		Uap amonia	
			UV 254	UV 366	UV 254	UV 366
Kuersetin	0,58	Coklat	pemadaman	Hijau kekuningan	Pemadaman	Hitam
Ekstrak Etanol 70%	0,33	Coklat	pemadaman	Biru hijau	Pemadaman	Biru hijau (pudar)
Ekstrak Etil Asetat	0,71	-	pemadaman	Orange, merah muda	Pemadaman	Warna pudar atau menghilang

Berdasarkan Tabel 7, senyawa flavonoid untuk ekstrak etanol 70% menghasilkan warna biru hijau, sedangkan untuk ekstrak etil asetat menghasilkan warna orange merah muda setelah disemprot dengan pereaksi deteksi sitroborat pada UV 366 nm. Hasil ini sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Markham (2005) bahwa terdeteksi adanya flavonoid jika timbul pemadaman bercak pada UV 254 nm, sedangkan pada UV 366 nm flavonoid berflouresensi kuning (orange), merah muda, biru, hijau pada lempeng KLT setelah penyemprotan dengan pereaksi deteksi sitroborat. Pereaksi semprot sitroborat merupakan pereaksi spesifik berkepekaan tinggi untuk mendeteksi flavonoid.

Berdasarkan Tabel 8, senyawa flavonoid untuk ekstrak etanol 70% biru-hijau berkurang atau redup, sedangkan untuk ekstrak etil asetat menghasikan warna hijau berkurang atau redup setelah diuap ammonia pada UV 366 nm. Hal ini sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Hanani (2015) bahwa terdeteksi adanya flavonoid jika timbul perubahan warna sedikit atau tanpa perubahan pada UV 366 nm.

Jarak pengembangan dari suatu senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan nilai Rf yaitu jarak yang ditempuh oleh tiap bercak dari titik penotolan diukur ke pusat bercak. Nilai Rf biasanya berkisar antara 0,2 – 0,8 dan nilai Rf ini sangat berguna untuk mengidentifikasi suatu senyawa. Dari hasil Tabel 6 dan Tabel 7 diketahui bahwa ekstrak etanol 70% daun galing memiliki nilai Rf hampir mirip atau mendekati dengan pembanding kuersetin yang artinya bahwa keduanya mengandung senyawa flavonoid yang jenisnya sama yaitu golongan flavonol. Flavonol umumnya terdapat dalam bentuk glikosida dalam bentuk umumnya seperti kaemferol, kuersetin dan mirisetin (Arifin 2018).

H. Aktivitas Hepatoprotektor terhadap Kadar ALP

Aktivitas hepatoprotektor pada ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol 70% daun galing didasari oleh kandungan senyawa aktifnya. Senyawa aktif yang diduga memiliki daya hepatoprotektor yaitu senyawa flavonoid dimana senyawa ini merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti C_6-C_3-C_6 yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan heterosiklik (Hanani 2015). Senyawa flavonoid memiiki daya hepatoprotektor salah satunya dengan cara menekan pembentukan radikal bebas dengan cara penghambatan enzim atau pengelatan ion logam yang terlibat dalam produksi radikal bebas (Suhartono 2016).

Alkalin phospat (ALP) merupakan salah satu enzim yang terdapat dalam hati tepatnya di kanalikuli empedu (Herrington 2016). Pada hewan uji (tikus) berdasarkan gambaran hematologinya diketahui kadar normal ALP dalam tikus adalah 56,8-128 U/I (Kusumawati 2016). Berdasarkan hasil pengukuran kadar, dapat dikatakan hewan uji yang diinduksi dengan nitrobenzen sudah mengalami kerusakan hati ditandai dengan meningkatnya nilai kadar dari ALP diatas dari rentang nilai normal pada hewan uji (139,8 ± 8,81 U/I) (Tabel 8).

Hasil pengukuran awal kadar ALP setelah 7 hari perlakuan sudah menunjukan terjadinya penurunan kadar namun belum mencapai efek optimal. Sehinggal perlakuan terus dilanjutkan hingga 14 hari. Setelah pengukuran 14 hari akhirnya diperoleh nilai ALP yang mencapai target terapi, yaitu kelompok normal 66 U/L, kelompok postitif 76 U/L, kelompok perlakuan ekstrak etil asetat 105 U/L,

kelompok perlakuan ekstrak etanol 70 % 89 U/L dan kelompok negatif 139,8 U/L (hasil tersaji pada Tabel 9).

Pada penelitian ini sylimarin digunakan sebagai pembanding pada kelompok positif. Berdasarkan hasil pengukuran kadar ALP kelompok positif memiliki nilai kadar ALP yang hampir sebanding dengan kelompok normal. Hal tersebut menunjukan bahwa legalon mempunyai efek hepatoprotektor yang baik. Legalom merupakan sebuah produk yang mengandung sylimarin, dimana menurut review junal Fraschini *et al.*(2002).Silymarin dapat berperan sebagai peredam radikal bebas dengan mengganggu proses peroksidasi lipid yang terlibat dalam kerusakan hati yang diproduksi oleh senyawa toksik.

Tabel 9. Rerata Hasil AkhirPengukuran Kadar ALP

Perlakuan	Kadar ALPU/L± SD
Normal	66 ± 6,63
Positif	76 ± 6,30
Negatif	139,8 ± 8,81
Ekstrak etil asetat	105 ± 9,40
Ekstrak etanol 70%	89 ± 7,31

Berdasarkan Tabel 8 diketahui ekstrak etil asetat dan etanol 70% menunjukan penurunan kadar ALP dan memenuhi efek optimal terapi sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etil asetat dan etanol 70% memiliki efek hepatoprotektor. Pada kelompok perlakuan ekstrak etanol 70% memiliki efek hepatoprotektor yang lebih baik dibandingkan dengan kelompok ekstrak etil asetat. Hal tersebut didukung dengan hasil pengukuran kadar flavonoid total dimana ekstrak etanol 70% daun galing memiliki kadar flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat.

I. Aktivitas Hepatoprotektor terhadap Kadar AST DAN ALT

Alanine Transaminase (ALT) dan Aspartate Transaminase (AST) merupakan salah satu enzim yang diproduksi di hati dan dikeluarkan kedalam darah sehingga dengan adanya peningkatan enzim-enzim transaminase dalam serum yang terdiri dari AST yang disekresikan secara paralel dengan ALT menjadi penanda dini untuk mendeteksi adanya kerusakan hati (Rahayu 2018).

Kadar nilai normal AST dan ALT pada manusia, untuk kadar AST yaitu 5-35 IU/L dan untuk kadar AST yaitu 5-40 IU/L (pondaag 2014). Kadar nilai normal

AST dan ALT pada hewan uji tikus putih yaitu untuk kadar AST 45,7-80,8 U/l dan untuk kadar ALT 17,5-30,2 U/l (Diah 2016). Berdasarkan hasil pada Tabel 10 terlihat adanya perbedaan antara awal dalam kondisi normal sebelum diberikan perlakuan dan kadar setelah diberikannya nitrobenzen. Hal ini dapat dikatakan bahwa hewan uji yang diinduksi nitrobenzen sudah mengalami kerusakan hati ditandai dengan meningkatnya nilai kadar AST dan ALT diatas dari rentang nilai normal pada hewan uji.

Tabel 10. Kadar AST dan ALT Setelah Induksi Nitrobenzen

Kelompok	Tikus	AST (U/l)		ALT (U/l)	
		Kadar dalam kondisi normal sebelum diberikan perlakuan	Kadar setelah diinduksi nitrobenzen	Kadar dalam kondisi normal sebelum diberikan perlakuan	Kadar setelah diinduksi nitrobenzen
Kelompok Normal	1	50	-	19	-
	2	47	-	24	-
	3	52	-	19	-
	4	55	-	18	-
	5	49	-	21	-
Kelompok Negatif	1	47	88	28	38
	2	49	89	20	33
	3	51	84	22	35
	4	46	85	19	34
	5	50	83	20	36
Kelompok Positif	1	49	89	20	38
	2	54	85	24	35
	3	52	93	18	40
	4	47	90	26	36
	5	48	82	19	34
Kelompok Ekstrak Etanol 70%	1	50	96	21	35
	2	55	94	25	41
	3	48	87	24	31
	4	46	97	23	39
	5	51	90	26	36
Kelompok Ekstrak Etil Asetat	1	53	97	24	35
	2	50	94	22	38
	3	47	96	25	40
	4	55	87	23	33
	5	49	91	22	42

Pengukuran di hari ke-7 menunjukan penurunan kadar AST dan ALT tetapi belum optimal sehingga dilanjutkan perlakuan selama 14 hari. Pada hari ke-15 dilakukan pengukuran kadar AST dan ALT akhir. Hasil menunjukan bahwa ekstrak

daun galing yang diberikan selama 14 hari memiliki aktivitas sebagai hepatoprotektor (Tabel 10).

Kadar AST dan ALT diuji secara statistik menggunakan uji normalitas (uji Shapiro walk) untuk kadar AST diperoleh data 0,056>0,05 dan untuk kadar ALT diperoleh data 0,063>0,05 yang artinya data terdistribusi normal, dan uji homogenitas untuk kadar AST diperoleh data 0,261>0,05 dan untuk kadar ALT 0,235>0,05 yang artinya data memiliki varian yang homogen. Hasil uji ANOVA untuk kadar AST menunjukan nilai signifikan 0,005<0,05 dan untuk kadar ALT menunjukan nilai signifikan 0,005<0,05 yang artinya terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan terhadap kadar AST dan ALT.

Tabel 11. Hasil Pengukuran Rata-Rata Kadar AST dan ALT

Kelompok	Selama 7 hari		Selama 14 hari	
	AST (U/I) ± SD	ALT (U/I) ± SD	AST (U/I) ± SD	ALT (U/I) ± SD
Normal	50,60± 2,40	20,20± 2,77	50,60±2,40	20,20± 2,77
Negatif	91,00± 3,39	36,20± 2,30	94,40± 3,84	38,20± 1,92
Positif	85,20± 4,32	32,40± 1,67	62,40± 3,84	23,80± 2,58
Ekstrak Etanol 70%	86,80±3,34	33,20±2,07	65,20± 1,92	24,20± 2,77
Ekstrak Etil Asetat	88,20± 3,80	35,40± 2,70	73,00± 5,09	29,40± 0,54

Berdasarkan Tabel 11, diketahui hasil penetapan kadar AST dan ALT pada kelompok negatif yang diinduksi nitrobenzene meningkatkan menjadi (AST 94,40 ± 3,84 U/I) dan (ALT 38,20 ± 1,92 U/I). Hal ini menunjukkan telah terjadi kerusakan pada hati (Diah 2016).. Peningkatan kadar AST dan ALT disebabkan karena enzim-enzim transaminase yang terdapat pada sel hepatosit keluar dan masuk kedalam sirkulasi darah sehingga menyebabkan kadar enzim didalam darah meningkat. Dari hasil rata-rata kadar AST dan ALT ektrak etanol 70% dan etil asetat diketahui bahwa ekstrak yang mendekati kelompok kontrol positif adalah pada ekstrak etanol 70% yaitu masing-masing berurutan 65,20 ± 1,92 U/I dan 24,20 ± 2,77 U/I. Hal ini menunjukan kemampuan perlakuan ekstrak etanol 70% sebagai hepatoprotektor dalam menghambat efek hepatotoksik lebih baik dibandingkan dengan perlakuan ekstrak etil asetat. Hal ini juga diperkuat dengan hasil histopatologi yang menunjukan bahwa ekstrak etanol 70% mampu memberikan hasil sel hepatosit yang lebih baik dari ekstrak etil asetat (Gambar 7).

Hasil perhitungan jumlah sel inti piknotik menunjukan nekrosis terbesar terjadi pada kelompok negatif yaitu 72 sel inti piknotik. Semakin besar jumlah sel inti piknotik artinya semakin parah kondisi kerusakan hatinya (wijayanti 2013). hal ini membuktikan bahwa pemberian nitrobenzen dapat terjadi kerusakan pada hati sehingga dapat menimbulkan terjadinya nekrosis pada sel hati. Untuk kelompok lainnya berdasarkan hasil pengamatan menunjukan kelompok normal mempunyai jumlah sel inti piknotik yaitu 25, kelompok positif mempunyai jumlah sel inti piknotik yaitu 33, kelompok perlakuan ekstrak etanol 70% menghasilkan efek perlindungan yang baik yaitu jumlah sel inti inti piknotiknya 42, dibandingkan kelompok perlakuan ekstrak etil asetat yaitu 52 , walaupun sama-sama jumlah sel inti piknotiknya berkurang tetapi kelompok perlakuan ekstrak 70% jumlah sel inti piknotiknya lebih sedikit dibandingkan dengan kelompok ekstrak etil asetat.

Kadar AST dan ALT menurun serta jumlah inti piknotik yang sedikit karena memiliki aktivitas hepatoprotektor. Senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai hepatoprotektor pada daun galing terdapat pada senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid memiliki daya hepatoprotektor salah satunya dengan cara menekan pembentukan radikal bebas degan cara penghambatan enzim (Suhartono 2016). Flavonoid merupakan senyawa polar, maka flavonoid akan larut baik dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton dan lain-lain. Flavonoid akan terdistribusi secara luas pada jaringan tanaman dalam bentuk glikosida yang bersifat polar (Khoddami 2013). Hal ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% mempunyai aktivitas hepatoprotektor yang lebih baik ditandai dengan aktivitas penurunan kadar AST dan ALT.

J. Aktivitas Hepatoprotektor terhadap Kadar Bilirubin

Bilirubin terjadi dari hasil peruraian hemoglobin dan merupakan produk antara dalam proses hemolisis. Bilirubin di metabolisme oleh hati dan dieksresi ke dalam empedu sedangkan sejumlah kecil ditemukan dalam serum. Peningkatan bilirubin terjadi jika terdapat pemecahan sel darah merah berlebihan atau jika hati tidak dapat mensekresikan bilirubin yang di hasilkan (Kemenkes 2011). Bilirubin merupakan hasil pemecahan sebagian heme dari hemoglobin yang berasal dari sel darah merah yang sudah tua. Bilirubin dapat bersifat toksik tetapi secara normal dapat dijadikan menjadi tidak berbahaya dengan cara berikatan dengan albumin, kemudian

dikonjugasikan dan disekresikan oleh hati (Wang dkk. (2006) dalam Komara dkk. (2014). Bilirubin dapat dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu bilirubin terkonjugasi (*direct*) dan bilirubin tak terkonjugasi (*indirect*) (Pirone dkk. 2009).

Tabel 12. Kadar Rerata Awal Bilirubin Direct dan Bilirubin Total Setelah Induksi Nitrobenzen

Perlakuan	Kadar awal bilirubin direct	Kadar bilirubin direct setelah diinduksi nitrobenzen	Kadar awal bilirubin total	Kadar bilirubin total setelah diinduksi nitrobenzen
Normal	0,17±0,01	-	0,24±0,02	-
Negatif	0,19±0,03	0,48 ±0,08	0,20±0,05	0,71±0,03
Positif	0,21±0,03	0,49 ±0,02	0,31±0,04	0,77±0,04
Ekstrak etil asetat	0,23±0,02	0,47±0,02	0,30±0,03	0,76±0,02
Ekstrak etanol 70%	0,21±0,02	0,46±0,02	0,32±0,06	0,73±0,03

Dari hasil kadar awal bilirubin direct dan setelah induksi nitrobenzene pada Tabel 12 diketahui tiap kelompok menunjukkaan bahwa tikus sudah mengalami kerusakan pada hati setelah diberi induksi nitrobenzen (>0,30mg/dL) (Thapa & Walia 2007). Hasil juga terlihat pada bilirubin total tikus melebihi *range* nilai normal 0,00-0,55 mg/dL(Komara dkk. 2014). Kerusakan yang terjadi pada hepatosit menyebabkan bilirubin keluar menuju aliran darah dan kadar bilirubin total dan direct didalam darah meningkat (Panjaitan dkk. 2007 dalam Komara dkk. 2014).

Tabel 13. Kadar Rerata Akhir Bilirubin Direct dan Bilirubin Total Setelah Induksi Nitrobenzen

Perlakuan	Kadar Bilirubin Direct mg/dL ± SD	Kadar Bilirubin Total mg/dL ± SD
Normal	0,17 ± 0,01	0,24 ± 0,02
Negatif	0,37 ± 0,04	0,60 ± 0,01
Positif	0,22 ± 0,01	0,33 ± 0,03
Ekstrak Etil asetat	0,28 ± 0,01	0,50 ± 0,02
Ekstrak Etanol 70%	0,24 ± 0,01	0,38 ± 0,04

Dilihat dari Tabel 13 menunjukkan hasil rerata yang didapat dari ekstrak etanol 70% dan ekstrak etil asetat daun galing mampu menurunkan kadar bilirubin direct dan total. Hasil uji ANOVA satu arah dengan taraf signifikansi (α=0,05) dan diperoleh nilai Sig. 0,000<0,05 pada masing-masing pengujian bilirubin direct dan total menunjukkan adanya perbedaan signifikan terhadap penurunan kadar bilirubin dari masing-masing kelompok. Dari Tabel 13 diketahui bahwa ekstrak

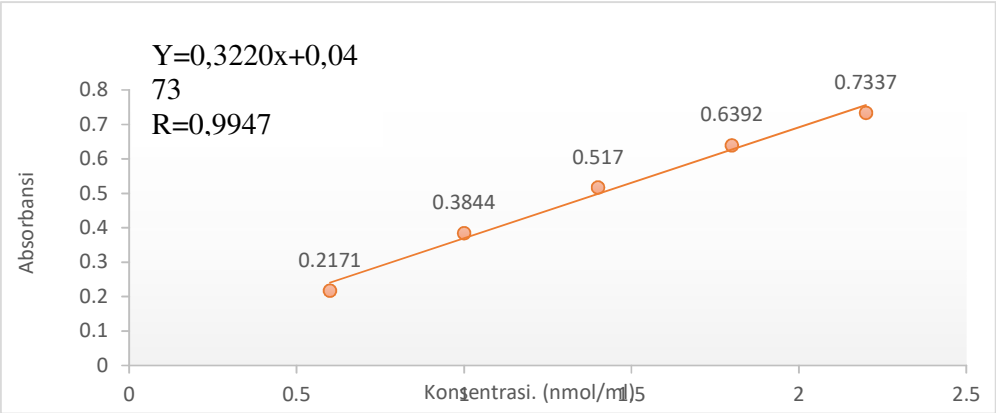
etanol 70% dan ekstrak etil asetat daun galing mempunyai aktivitas hepatoprotektor. Ekstrak etanol 70% mempunyai aktivitas lebih baik dibandingkan dengan etil asetat. Hasil uji Tuckey juga mendapatkan bahwa ekstrak etanol 70% mempunyai kemampuan yang sebanding dengan kelompok positif (Sylimarin) dalam menurunkan kadar bilirubin direct dan total ($p=0,103 > 0,05$). Hal ini juga diperkuat dengan hasil histopatologi yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% mampu memberikan hasil degenerasi sel hepatosit yang lebih baik dari ekstrak etil asetat ditinjau dari sel piknotik dan sel kuffer dilihat pada Gambar 7.

K. Aktivitas Hepatoprotektor terhadap Kadar MDA

Hepatoprotektor adalah suatu istilah yang diberikan pada obat atau obat herbal yang dapat melindungi hati atau memulihkan hati (Mun'im 2011). Senyawa aktif yang diduga memiliki aktivitas hepatoprotektor yaitu senyawa fenol. Senyawa fenol terdiri dari beraneka ragam struktur dengan ciri khas berupa cincin aromatik yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil. Senyawa fenol memiliki aktivitas hepatoprotektor salah satunya dengan cara menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya dan membentuk radikal yang stabil. Terbentuknya radikal stabil ini dikarenakan elektron bebas yang terdapat pada radikal distabilkan oleh delokalisasi elektron dengan adanya resonansi pada cincin aromatik (Tursiman dkk. 2012).

Salah satu indikator kerusakan hati akibat radikal bebas adalah MDA. MDA merupakan salah satu senyawa produk oksidasi lipid dalam tubuh yang digunakan sebagai indikator terjadinya proses oksidasi lipid akibat radikal bebas (Momuat *et al.* 2011). Pada penelitian ini kurva kalibrasi TEP dibuat terlebih dahulu sebelum menentukan kadar MDA. TEP akan digunakan sebagai standar, karena TEP merupakan senyawa prekusor dari senyawa MDA, TEP dalam suasana asam akan terhidrolisis menghasilkan hemiasetal dan etanol, kemudian hemiasetal akan terdekomposisi menjadi etanol dan MDA (Widyaningsih dkk. 2015). Larutan TEP diencerkan dan dibuat menjadi 5 konsentrasi yang berbeda untuk dibuat kurva kalibrasi. Kurva kalibrasi TEP dapat dilihat pada Gambar 7.

Hasil persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi TEP kemudian digunakan untuk menentukan kadar MDA. Pengukuran kadar MDA dilakukan dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Sustance* (TBARS). Reaksi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA menghasilkan produk akhir yang stabil berupa MDA-TBA dan akan memberikan warna pink yang dapat diperiksa secara spektrofotometri pada panjang gelombang 532-535 nm (Tangvarasittichai, 2015).

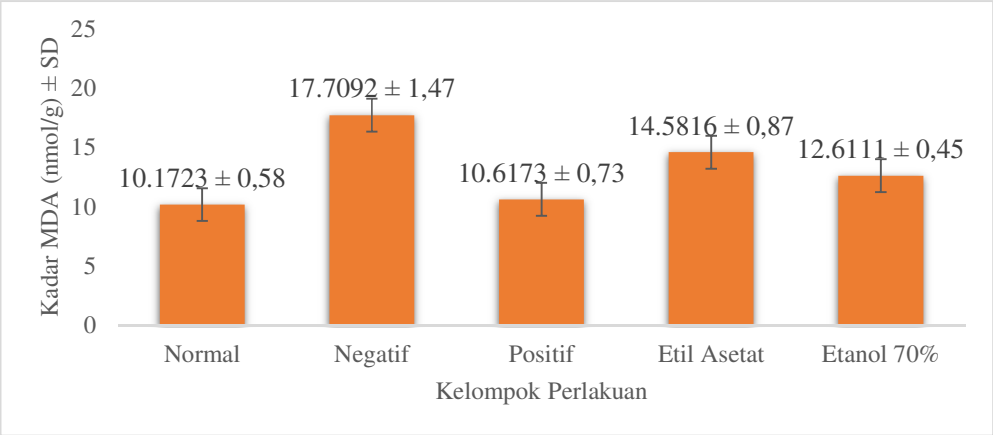


Gambar 5. Kurva Kalibrasi TEP

Pengukuran kadar MDA menggunakan metode TBA test. Metode TBA test didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam. Diukur berdasarkan absorbansi di spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 532 nm.

Dari Gambar 6 terlihat bahwa kelompok negatif yang menunjukkan kadar MDA terbesar dari setiap kelompok (17,7092 nmol/g). Hal ini dapat membuktikan bahwa pemberian induksi Nitrobenzen dapat menyebabkan jumlah radikal bebas dalam hati tikus meningkat. Kerusakan hati berupa nekrosis, nekrosis adalah kematian sel atau jaringan pada organisme hidup, ditandai dengan perubahan morfologi sebagai tindakan degradasi progresif oleh enzim-enzim pada sel yang terjejas (Pramono 2012). Menurut Sudiono dkk. (2003) salah satu penyebab terjadinya nekrosis adalah paparan bahan kimia yang bersifat toksik misalnya nitrobenzen. Selain itu efek toksik dengan adanya radikal bebas juga terlihat dari jumlah inti sel piknotik dari pemeriksaan histologi tikus (Taher *et al.* 2012). Pada kelompok negatif diketahui juga jumlah inti piknotik sebesar 72 (Gambar 7). Dari

hasil uji ANOVA juga diketahui bahwa terdapat perbedaan bermakna diantara kelompok perlakuan (p<0,05).

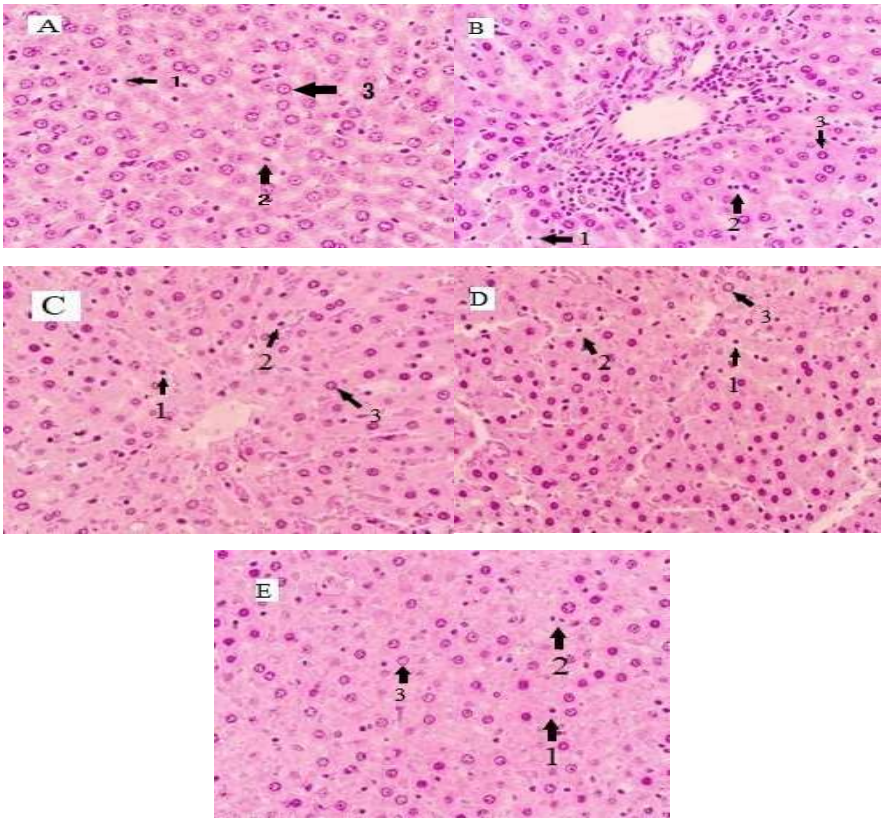


Gambar 6. Hasil Kadar MDA Organ Hati

Dari Gambar 6 juga diketahui bahwa kelompok positif (Silymarin) memiliki kadar MDA rata-rata sebesar 10,6173 nmol/g dimana angka ini mendekati kelompok normal sebesar 10,1723. Hal ini memperlihatkan bahwa pengobatan menggunakan silymarin memiliki efek yang optimal. Silymarin merupakan senyawa kompleks dari delapan senyawa utama yang terkandung dalam *Silybum marianum.* Selain silymarin, terdapat tujuh senyawa lain yang termasuk golongan flavonolignan yaitu silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin, isosilychristin, silydianin dan satu senyawa flavonoid yaitu taxifolin (Polyak *et al.* 2010). Silymarin memberikan efek hepatoprotektif melalui beberapa mekanisme diantaranya aktivitas antioksidan dan penangkapan radikal bebas, peningkatan konsentrasi glutathione seluler, stimulasi polimerasi DNA, dan stabilisasi membran hepatoselular (Shaker E, 2010). Stimulasi polimerase DNA oleh silymarin menghasilkan peningkatan sintesis RNA ribosom untuk rekontruksi sel hati. Peningkatan konsentrasi glutamin seluler menstabilkan superoksida dismutase dan glutathione peroxidase. Silymarin menurunkan pembesaran hati dengan menghambat siklus 5-lipoksigenase dan menghambat produksi leukotrien dan radikal bebas pada sel Kuppfer hati. Selain itu, silybin pada sel hepatosit dapat menghambat produksi lipid peroksidase dan kerusakan sel (Loguercio C, 2011).

Dari rata-rata kadar perlakuan ekstrak, kadar kelompok etanol 70% memiliki aktivitas yang paling baik dibandingkan etil asetat yaitu dengan kadar MDA sebesar

12,61 nmol/g dengan jumlah inti piknotiknya pada pemeriksaan histopatologi sebesar 42 sedangkan kelompok etil asetat kadar MDA yang didapat sebesar 14,58 nmol/g dengan jumlah inti piknotiknya sebesar 52 lebih (Gambar 6). Penurunan kadar MDA juga sinergis dengan jumlah piknotik, sehingga semakin besar jumlah sel inti piknotik artinya semakin parah kondisi kerusakan hatinya (wijayanti 2013). Hasil perhitungan jumlah sel inti piknotik menunjukan nekrosis terbesar terjadi pada kelompok negatif yaitu 72 sel inti piknotik. PGambaran dari inti piknotik pada organ hati dapat dilihat pada Gambar 7.



Keterangan: (A) Histopatologi hati kelompok normal. (B) Histopatologi hati kelompok negatif (nitrobenzen) (C) Histopatologi hati kelompok positif (nitrobenzen + silymarin) (D) Histopatologi hati kelompok ekstrak etil asetat + nitrobenzen, (D) Histopatologi hati kelompok ekstrak etanol 70% + nitrobenzen, tanda panah menunjukan nomor (1) Inti Piknotik. (2) Sel Kuffer, (3) Sel Hepatosit, yang berada pada sel hepatosit dan sinusoid dengan perbesaran 400x.

Gambar 7. Gambaran Histopatologi Hati

Aktivitas antioksidan yang baik dari ekstrak etanol 70% ini juga terkait dengan kadar total fenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan etil asetat. ada esktrak etanol 70% jumlah inti piknotik yang lebih kecil dari etil asetat dipengaruhi tingginya senyawa fenol yang didapat dibandingkan dengan etil asetat. Semakin

tinggi kandungan fenol dalam suatu ekstrak semakin tinggi pula aktivitasnya sebagai antioksidan (Huang *et al*. 2005). Hal ini juga didukung oleh penelitian Hadriyono (2011) terhadap kulit manggis (*Garcinia mangostana* L) yang menunjukan bahwa terdapat hubungan yang berbanding lurus antara kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan. Senyawa fenol menghambat radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya dan membentuk radikal yang stabil. Terbentuknya radikal stabil ini dikarenakan elektron bebas yang terdapat pada radikal distabilkan oleh delokalisasi elektron dengan adanya resonansi pada cincin aromatik (Tursiman dkk. 2012). Hal ini didukung oleh Fahrudin (2015) yang melaporkan bahwa senyawa fenol juga berpotensi sebagai hepatoprotektor karena mampu menurunkan kadar enzim hepar seperti AST, ALT, ALP dan bilirubin didalam darah

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa baik pemberian ekstrak etil asetat maupun ekstrak etanol 70% daun galing mempunyai aktivitas hepatoprotektor dilihat dengan penurunan kadar ALP, AST dan ALT, bilirubin, dan MDA. Ekstrak etanol 70% memiliki aktivitas hepatoprotektor lebih baik dari ekstrak etil asetat dilihat dari kadar ALP, AST dan ALT, bilirubin, dan MDA serta jumlah inti piknotik yang lebih sedikit dari gambaran histopatologi hati tikus dan ekstrak etanol memiliki aktivitas hepatoprotektor yang sebanding dengan Sillymarin (Legalon) sebagai kontrol positif ($P > 0,05$).

B. Saran

Perlu dilakukan pemeriksaan lanjutan terkait uji toksisitas, pengecekan enzim antioksidan yang terdapat dalam hati seperti SOD, GSH, Katalase untuk memastikan jumlah antioksidan yang terdapat didalam ekstrak etanol 70% dan peningkatan ke tahap fraksinasi sehingga didapat senyawa yang lebih potensial sebagai agen hepatoprotektor pada daun Galing.

BAB 6. DAFTAR PUSTAKA

Arifin B, Ibrahim S. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. Dalam: *Jurnal Zarah*. Jurusan Kimia, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.

DepKes RI. (1995). Materia Medika Indonesia. Jilid VI. Cetakan Keenam. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

DepKes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.

Fahrudin, F., Solihin Duryadi, D., Kusumorini, N., & Ningsih, S. (2015). Isolasi Efektifitas Ekstrak Gambir (Uncaria gambir (Hunter) Roxb.) sebagai Hepatoprotektor pada Tikus (Rattus norvegicus L.) yang Diinduksi CCl4. Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia, 13(2), 115–122.

Fraschini F, G. Dermatini and D. Esposti. 2002. Pharmacology of Silymarin. Milan. *Departement of Pharmacology of Milan.*

Feriadi E, Muhtadi A, Barliana I. 2018. Galing (Cayratia trifolia L.): Sebuah Kajian Biologi, Fitokimia dan Aktivitas Farmakologi. Dalam: Jurnal Farmasi, Sains, dan Kesehatan. Departemen Farmakologi dan Biologi Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran.

Hanani, E. 2015. *Analisis Fitokimia*. Buku Kedokteran. Jakarta. EGC.

Hadriyono, Kukuh, R.P., 2011, Karakter Kulit Manggis, Kadar Polifenol Dan Potensi Antioksidan Kulit Manggis (Garcinia Mangostana L.) Pada Berbagai Umur Buah Dan Setelah Buah Dipanen. *Skripsi*.

Herrington, C. Simon. 2016. *Muir Buku Ajar Patologi.* Jakarta. *EGC.*

Homhual S, Tongngok P, Sonsrakhu S dan Bonjim J. 2014. Evaluation of Biological Activities of Crude Extracts from Cratoxylum formosum (jack.) Dyer. And Cayratia trifolia L. Domin. Young Shoots. International Journal Research. 9(2), 2550.

Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005, March 23). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

Jun, M., Fu, H. Y., Hong, J., Wan, X., Yang, C. S., & Ho, C. T. (2003). Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (Pueraria lobata

Ohwi). *Journal of Food Science*, 68(6), 2117–2122. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07029.x

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2011). Pedoman interpretasi data klinis. January.

Kemenkes RI. 2018. Riset Kesehatan dasar (RISKESDAS). Jakarta. Balitbang Kemenkes RI.

Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. 2013. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. Dalam: *Journal Molecules*. Departement of Plant and Food Sciences, University of Sydney, Australia.

Kumar D, GURU, Vattachanakkal M. L, Muthaiyan A. R, Laksmanan T, Periasamy M, Veliyur K. G. 2011. Hepatoprotective Activity of Cayratia trifolia L. Againt Nitrobenzena induced Hepatotoxicity. Departemen of BioChemistry, Karpagam Art and Science collegea.

Kumar, D., Gupta, J., Kumar, S., Arya, R., Kumar, T., & Gupta, A. (2012). Pharmacognostic evaluation of Cayratia trifolia (Linn.) leaf. Asian Pacific *Journal of Tropical Biomedicine*, 2(1), 6–10.

Kusnadi K, Devi E. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Ekstrak Daun Seledri (Apium graveolens L.) Dengan Metode Refluks. Dalam: *Jurnal Ups*. Program Studi Farmasi, Politeknik Harapan Bersama Tegal.

Kusumawati Diah. 2016. *Bersahabat Dengan Hewan Coba*. Yogyakarta. UGM Press.

Loguercio C, Festi D. 2011. Silybin and The Liver: From Basic Research To Clinical Pratice. Dalam Jurnal: *World J. Gastroenterol*. 17: 2288-2301.

Markham K.R, Andersen O. 2005. *Flavonoid Chemistry, Biochemistry and Applications.* Taylor and Francis Group, Baca Raton, London, New York.

Maulina M. 2018. Zat Zat Yang Mempengaruhi Histopatologi Hepar. Sulawesi. Unimal Press. Hlm: 1.

Merinda, D. 2014, 'Hepatoprotective Effect of Curcumin In Chronic Hepatitis'. Faculty of Medicine, Lampung University, Vol.3, No.7, 2014: 52-56

Momuat, L. I., Sangi, M. S., & Purwati, N. P. (2011). Pengaruh VCO mengandung ekstrak wortel terhadap peroksidasi lipid plasma. Jurnal Ilmiah Sains, 15(1), 296. 11.

Mu'nim, Hanani. 2017. Fitoterapi Dasar. Jakarta. Penerbit Dian Rakyat.

Nuria, M., Faizatun, A., & Sumantri. (2009). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (Jattopha curcas L) terhadap bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923, Escherichia coli ATCC 25922, dan Salmonella typhi ATCC 1408. Mediagro, 26(2), 26–37.

Panjaitan, R. G. P., E. Handharyani, Chairu, Masriani, Z. Zakiah & W. Manalu. 2007. Pengaruh pemberian Karbon Tetraklorida terhadap Fungsi Hati dan Ginjal Tikus. *Makara Kesehatan* 11 (1): 11-16

Park, C. M., Cha, Y. S., Youn, H. J., Cho, C. W., dan Song, Y.S., 2010. Amelioration of Oxidative Stress by Dandelion Extract through CYP2E1 Suppression against Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride in Sprague-dawley Rats. Phytotherapy Research, 24 (9), 1347– 1353.

Permadi, A. (2015). Perbandingan Metode Ekstraksi Bertingkat Dan Tidak Bertingkat Terhadap Flavonoid Total Herba Ciplukan Secara Kolorimetri. Afif Permadi Sutanto Sri Wardatun, 19, 7.

Pirone, C., J. Quirke, E. Martin, Priestap, A. Hoerico, Lee & W. David. 2009. *Journal of the Americcan Chemical Society* 131 (8): 2830-2840.

Polyak, S. J., Morishima, C., Lohmann, V., Pal, S., Lee, D. Y. W., Liu, Y., … Oberlies, N. H. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(13), 5995–5999.

Pramono, S. 2012. Pengaruh Formalin Peroral Dosis Bertingkat Selama 12 Minggu Terhadap Gambaran Histopatologis Hepar Tikus Wistar. *Skripsi.* Hal.14-16.

Public Health England (PHE). 2018. *Nitrobenzene, Toxicological Overview.* Protecting and improving the nation's health.

Rahayu L, Yantih N, Supomo Y. 2018. Analisis SGPT dan SGOT pada Tikus yang Diinduksi Isoniazid untuk Penentuan Dosis dan Karakteristik Hepatoprotektif Air Buah Nanas (Ananas comosus L. Merr) Mentah. Dalam: *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

Roat, C., dan M, Saraf. 2017. Isolation and Screening of Resveratrol Producing Endphytes From Wild Grape Cayratia trifolia. International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology. 4(11).

Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung. Penerbit ITB, Hlm: 71-285.

Rondang Tambun, Harry P. Limbong, Christika Pinem, & Ester Manurung. (2017). Pengaruh ukuran partikel, waktu dan suhu pada ekstraksi fenol dari lengkuas merah. *Jurnal Teknik Kimia* USU, 5(4), 53–56.

Rumayati Destiarti, L., Idiawati, N., .2014. Uji Aktivitas Antioksidan, Total Fenol dan Toksisitas dari Ekstrak Daun dan Batang Lakum (Cayratia trifolia (L) Domin). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*.

Sa'adah, H., & Nurhasnawati, H. (2015). Perbandingan Pelarut Etanol dan Air pada Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Tiwai (Eleutherine americana Merr) Menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1(2), 149–153.

Saifudin A, Rahayu V, Teruna HY. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam.* Graha Ilmu, Yogyakarta. Hlm 4,7, 55-56, 69.

Sastrohamidjojo H. 2007. *Dasar-Dasar Spektrosfotokopi Edisi Kedua*. Jogjakarta. Liberty.

Shaker E, Mahmoud H, Mnaa S. 2010. Silymarin The Antioxidant Component and Silybum Marianum Extracts Prevent Liver Damage. Dalam Jurnal: *Food Chem Toxicol*. 48:803-806.

Suhartono Eko. 2016, *Toksisitas Oksigen Reaktif dan Antioksidan di Bidang Kedokteran dan Kesehatan*, Gosyen Publishing. Yogyakarta. Hlm. 82-83.

Sulaiman, A., Akbar, N., Lesmana, A., Noer, S. 2012. Buku Ajar Ilmu Penyakit Hati. Jakarta.Sagung Seto.

Taher, M., Alewi, N. A. M., Susanti, D., Zamli, Z., Ramli, N., & Saad, N. (2012). Toxic effects of Sapium baccatum (Ludai) extract in rats. Sains Malaysiana, 41(11), 1423–1429.

Tangvarasittichai, S. 2015. Oxidative Stress, Insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes melittus. *World Journal of diabetes,* Vol .6(3) :456-480.

Tursiman, Ardiningsih, P., & Nofiani, R. (2012). Total fenol fraksi etil asetat dari buah asam kandis (Garcinia dioica blume). Sains, 1(1), 45–48. Universitas Tanjungpura.

Wasito, Hendri. 2011. *Obat Tradisional Kekayaan Indonesia*. Yogyakarta: Graha Ilmu, Hlm 1.

Widyaningsih, Wahyu., Sativa, Riza., Primardiana, Indra. 2015. Efek Antioksidan Ekstrak Etanol Ganggang Hijau (*Ulva lactuca* L,) Terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) dan Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD) Hepar Tikus yang Diinduksi CCL4. Universitas Ahmad Dahlan. Yogyakarta.

Wijayanti T, Nopiyanti V, Purwidyaningrum I. 2013. Aktivitas Hepatoprotektor Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fsb.) pada Mencit Balb/C yang Diinduksi Vaksin Hepatitis B. Dalam: *Jurnal Farmasi Indonesia.* Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

Yuhernita, Juniari. 2014. Analisis Senyawa Metabolik Sekunder Dari Ekstrak Metanol Daun Surian Yang Berpotensi Sebagai Antioksidan. *Maraka Sains*.