

Original Article

The Effect of Methanolic Extract and Ethyl Acetate Fraction of Kepel Fruits to Lipid Peroxide Concentration in Liver of CCl₄-induced Rat

Pengaruh Ekstrak Metanol dan Fraksi Etil Asetat Buah Kepel terhadap Konsentrasi Lipid Peroksida pada Tikus yang diinduksi CCl₄

Mitsalina Fildzah Arifah¹, Sudibyo Martono^{1,2}, Sugeng Riyanto², Claude Mona Airin^{3*}

¹Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

³Departemen Anatomi dan Fisiologi Hewan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281, Indonesia

*Corresponding author: Claude Mona Airin | email: monairin@ugm.ac.id

Received: 1 October 2019; Revised: 30 October 2019; Accepted: 10 November 2019; Published: 6 December 2019

Abstract: Accumulation lipid peroxidation can lead to the formation of malondialdehyde to generate free radicals. Antioxidant will minimize free radical related health problems, such as natural antioxidant from meat of kepel (*Stelechocarpus burahol*) (Blume) Hook. F. & Thompson) fruits. Antioxidant activities of methanol extracts and acetate ethyl fractions meat of kepel fruits calculated profile of malondialdehyde concentration (ng/mL) in CCl₄ induced acute liver toxicity in female *Sprague Dawley* rats using ELISA competitively method. All of groups induced CCl₄ i.p. at 0 h, except untreated and solvent control group, then vitamin C, methanol extracts and acetate ethyl fractions p.o. once daily for 72 h. Identification of secondary metabolite was using phytochemical screening and Thin Layer Chromatography (TLC). Liver weighed and calculated relative organ weight (ROW) of liver, then all of data analyzed using statistic tests, *One Way ANOVA* and *Kruskall Wallis*. This study showed methanol extracts can decrease MDA concentration, ALT and AST were more potent (significantly $p < 0.05$) than acetate ethyl fractions and vitamin C. The TLC analysis identified methanol extracts have same polarity with quercetin ($R_f = 0,26$) and acetate ethyl fractions showed other flavonoid class, except rutin and quercetin. ROW of acute liver toxicity in rats increased significantly in CCl₄ and vitamin C groups.

Keywords: Antioxidant, lipid peroxidation, MDA, meat of kepel fruit.

Abstrak: Akumulasi lipid peroksida dapat memicu pembentukan malondialdehid yang menghasilkan radikal bebas. Antioksidan dapat meminimalkan radikal bebas yang menyebabkan masalah kesehatan, salah satunya antioksidan alami berasal dari daging buah kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook. F. & Thompson). Aktivitas antioksidan ekstrak metanolik dan fraksi etil asetat daging buah kepel diukur profil konsentrasi malondialdehid (ng/mL) pada liver tikus betina galur *Sprague Dawley* yang diinduksi CCl₄ menyebabkan toksisitas akut menggunakan metode ELISA secara kompetitif. Semua kelompok diinduksi dengan CCl₄ secara i.p. pada jam ke-0, kecuali kelompok tanpa perlakuan dan kontrol pelarut, dilanjutkan pemberian vitamin C, ekstrak metanolik dan fraksi etil asetat daging buah kepel p.o. setiap hari selama 72 jam. Identifikasi metabolit sekunder menggunakan skrining fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis. Liver ditimbang untuk menentukan nilai berat relatif organ liver (BRO), kemudian semua data dianalisis dengan uji statistik, *One Way ANOVA* dan *Kruskall Wallis*. Dalam penelitian ini, ekstrak metanolik dapat menurunkan konsentrasi MDA, AST dan ALT

(signifikan $p < 0,05$) dibandingkan fraksi etil asetat dan vitamin C. Analisis KLT pada ekstrak metanolik memiliki kepolaran mirip dengan kuersetin ($R_f = 0,26$) dan fraksi etil asetat menunjukkan adanya golongan flavonoid lain selain rutin dan kuersetin. BRO perlakuan hewan uji meningkat secara signifikan ($p < 0,05$) pada kelompok CCl_4 dan vitamin C.

Kata kunci: Antioksidan, lipid peroksida, MDA, daging buah kepel.

1. PENDAHULUAN

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat oksidasi radikal bebas, sehingga radikal bebas yang mengikat asam lemak tidak jenuh mengakibatkan terbentuknya lipid peroksida [7]. Lipid peroksida terbentuk akibat kelebihan produk *reactive oxygen species* (ROS) yang menyerang membran lipid dan protein dengan melibatkan residu asam lemak ganda dari fosfolipid yang sangat sensitif terhadap oksigen [33]. Lipid peroksida menghasilkan metabolit malondialdehid [33], sehingga antioksidan dapat mendetoksifikasi lipid peroksida, salah satunya antioksidan endogen seperti enzim katalase dan enzim α - GST [20].

Buah kepel (*Stelechocarpus burahol*) (Blume) Hook. F. & Thomson dikenal sebagai buah khas Yogyakarta yang sering dimanfaatkan masyarakat sebagai parfum, obat tradisional menghilangkan bau badan dan bahan kontrasepsi [18]. Buah kepel berwarna kecoklat-coklatan, bergerombol, diameternya 5-6 cm, dan berisi daging buah yang dapat dimakan [16]. Beberapa penelitian aktivitas antioksidan secara *in vitro*, buah kepel diketahui memiliki senyawa fenolik total dari ekstrak metanolik daging buah kepel dengan nilai IC_{50} 441,64 $\mu\text{g/mL}$ [29] dan ekstrak etil asetat buah kepel memiliki nilai IC_{50} 29,12 $\mu\text{g/mL}$ pada uji peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) [32]. Hasil skrining fitokimia daging buah kepel menunjukkan adanya metabolit sekunder golongan alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin, triterpenoid dan kuinon [30]. Menurut Batubara *et al.*[5] melaporkan pula bahwa hasil skrining fitokimia daging buah kepel dari Yogyakarta diketahui mengandung flavonoid dan tanin, sedangkan yang diambil dari Karanganyar hanya mengandung tanin. Pada penelitian fraksi etil asetat daging buah kepel menunjukkan adanya tiga isolat, salah satu isolatnya diketahui mengandung campuran senyawa Bis (2-etil heksil) ftalat dan etil oleat [23].

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak metanolik dan fraksi etil asetat daging buah kepel dapat dengan pemeriksaan sampel darah dan organ liver pada hewan uji yang terpapar CCl_4 secara akut. Pemeriksaan sampel darah diukur dengan konsentrasi malondialdehid dan profil enzim AST dan ALT. Pemeriksaan organ liver melalui berat relative organ (BRO) pada tikus yang diinduksi CCl_4 sehingga data dianalisis dengan uji statistik menggunakan aplikasi IBM SPSS versi 19. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan ekstrak metanolik dan fraksi etil asetat kepel berperan sebagai hepatoprotektif.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Sampel daging buah kepel yang diperoleh dari Dusun Mriyan, Seyegan, Sleman; diklorometan (Merck, pro analisis); etil asetat (Merck, pro analisis); Na_2SO_4 anhidrat (Merck, pro analisis); petroleum eter (Merck, pro analisis); metanol teknis; kain kassa; kertas saring kasar (berukuran 60 x 60 cm); akuades; rutin hidrat (Sigma); kuersetin dihidrat (Sigma); dan penyemprot sitroborat.

2.2. Instrumentasi dan Perangkat Lunak

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Malondialdehyde* (MDA) ELISA Kit, *Microcentrifuge* MPW-55, *Microplate Reader* (Bio-Rad, 680 XR) dan plat silika gel 60 F₂₅₄ (Merck). Data diolah dengan Microsoft Excel (Windows) untuk kemudian dilakukan analisis uji statistika *One Way Anova* dan *Kruskall Wallis* dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan program IBM SPSS versi 19.

2.3. Metode Ekstraksi dan Fraksinasi Daging Buah Kepel

Metode ekstraksi dan fraksinasi daging buah kepel mengacu pada [5]. Daging buah kepel dicuci, dikupas dan dipotong-potong kecil menggunakan blender, selanjutnya dimaserasi dengan metanol (2000g/L) dengan dilakukan 2 kali maserasi. Maserasi 1 digunakan 60% dari total metanol yang digunakan selama 3 x 24 jam dengan pengadukan dua kali sehari selama 15 menit. Maserasi 2 digunakan 40% dari total volume metanol yang digunakan, dilakukan selama 3 x 24 jam dengan pengadukan dua kali sehari selama 15 menit. Setelah maserasi selesai, dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* untuk diperoleh ekstrak kental daging buah kepel. Ekstrak metanolik ditimbang dengan neraca analitik sejumlah 50 g ditambahkan ke dalam 1000 mL akuades, lalu difraksinasi berdasarkan kepolarannya dari non-polar ke polar yakni pelarut petroleum eter, diklorometan, lalu etil asetat. Fraksinasi sampel menggunakan pelarut non polar hingga pelarut polar (perbandingan 1:1 v/v), dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan dan dibilas kembali (perbandingan 1:0,5 v/v) dengan pengulangan hingga lapisan atas berwarna jernih sesuai metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah.

2.4. Identifikasi Kualitatif Flavonoid

Penentuan identifikasi kualitatif flavonoid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) karena metode ini dipilih sebagai skrining awal golongan senyawa flavonoid. Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ yang bersifat polar. Fase gerak yang digunakan telah dimodifikasi dengan mengacu pada Markam & Andersen [22] adalah etil asetat: asam format: asam asetat glasial: air (100: 11: 11: 20 v/v/v) dan kloroform: etil asetat (60 : 40 v/v). Standar flavonoid yang digunakan rutin dan kuersetin. Sampel ditotolkan 2-3 tetes pada plat silika KLT, selanjutnya dielusi pada fase gerak yang telah dijenuhkan. Hasil bercak pada plat silika disemprot dengan pereaksi sitroborat, kemudian bercak dideteksi pada sinar tampak, UV_{254 nm} dan UV_{366 nm}.

2.5. Perlakuan Hewan Uji

Tikus galur Sprague Dawley, sehat, berumur 2-3 bulan, berat 110-160 g. Tikus yang digunakan sebanyak 42 ekor betina yakni 18 ekor untuk kelompok pemodelan hewan uji dan 24 ekor untuk kelompok perlakuan hewan uji dengan masing-masing 4 ekor setiap kelompoknya. Dalam penelitian ini, jumlah tikus setiap kelompok berdasarkan rumus Frederer 1967 yakni $(t-1) (n-1) \geq 15$ dimana t merupakan jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel tiap kelompok, sehingga digunakan 4 ekor tikus setiap kelompoknya. Hewan uji dikarantina menggunakan fasilitas kandang di Unit Layanan Penelitian Pra-klinik Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) UGM, Yogyakarta sesuai Surat Kelaikan Etik dengan No. 00128/04/LPPT/X/2017.

Tikus dikelompokkan menjadi 6 kelompok dengan masing-masing 4 ekor. Pada kelompok I merupakan kelompok tanpa diberikan perlakuan, kelompok II adalah kelompok kontrol pelarut CMC-Na 0,1% diberikan secara p.o., kelompok III-IV diberi induksi CCl₄ dalam minyak zaitun (1:1)

secara i.p. dengan pemberian ekstrak metanolik (kelompok III) dan fraksi etil asetat (kelompok IV) buah kepel secara p.o. Kelompok V diberi induksi CCl₄ dalam minyak zaitun (1:1) secara i.p. dengan pemberian vitamin C (antioksidan sintesis) secara p.o. Kelompok VI, tikus diinduksi menggunakan CCl₄ dalam minyak zaitun (1:1) secara i.p. Dosis ekstrak metanolik, fraksi etil asetat buah kepel dan pelarut CMC-Na 0,1% sebanyak 150 mg/kgBB dan dosis vitamin C sebesar 200 mg/kgBB. Pengambilan volume sampel (mL) secara per oral (p.o.) yang dihitung yakni:

$$\frac{\text{Berat Badan Tikus (g)} \times \text{Dosis } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kgBB}}\right)}{\text{Kadar sampel } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times 1000}$$

2.6. Pengukuran Konsentrasi Lipid Peroksida

2.6.1. Penyiapan serum darah

Tikus dianestesi menggunakan 0,1 mL ketamin 10% secara intramuskular. Daerah otot paha posterior tikus diusap dengan kapas beralkohol terlebih dahulu, lalu disuntikkan larutan ketamin dosis 50 mg/kgBB pada daerah otot tersebut. Setelah selesai, dicabut perlahan-lahan jarum suntik dan ditekan daerah tersebut dengan kapas beralkohol. Pengambilan sampel darah pada jam ke-0, 24, 48, dan 72 sebesar 1,5 mL menggunakan mikrohematokrit dengan menusukkan pipa kapiler pada plexus retroorbitalis (daerah sudut mata), diputar pipa kapiler perlahan-lahan sampai darah keluar. Sampel darah ditampung di dalam *microtube* berkapasitas 1,5 mL, kemudian dibiarkan menggumpal selama dua jam pada suhu kamar atau ditunggu selama semalam pada suhu 4 °C. Sampel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 3000 x g selama 10 menit, lalu diambil bagian supernatan (serum darah) menggunakan mikropipet. Serum darah disimpan pada suhu -80°C di dalam *deep freezer* untuk pengukuran konsentrasi lipid peroksida menggunakan MDA ELISA Kit, dilanjutkan pengukuran aktivitas enzim alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST). Setelah jam ke-72, tikus dinekropsi untuk diambil organ liver tikus.

2.6.2. Persiapan reagen ELISA Kit

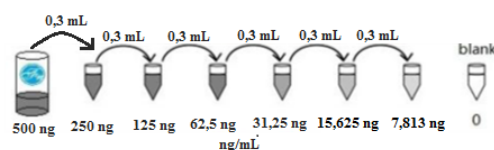
a) Penyiapan *wash buffer*

Wash buffer diambil sejumlah 30 mL, lalu diencerkan ke dalam 750 mL *deionized water*. Jika *wash buffer* tidak terpakai dapat disimpan pada suhu 4 °C. Apabila terbentuk kristal di dalam *wash buffer*, dapat dihangatkan dengan pemanasan 40°C sampai kristal benar-benar larut namun suhu pemanas tidak boleh melebihi 50°C, kemudian *wash buffer* harus didinginkan sampai suhu kamar apabila akan digunakan.

b) Penyiapan larutan standar malondialdehid

Pembuatan larutan standar 500 ng/mL diawali dengan dimasukkan 1 mL larutan standar 500 ng/mL ke dalam tabung standar 500 ng/mL, diaduk sampai homogen dan disimpan tabung pada suhu kamar selama 10 menit. Sejumlah 7 tabung *microtube* diberi label dengan tulisan 250 ng/mL (tabung pertama), 125 ng/mL (tabung ke-2), 62,5 ng/mL (tabung ke-3), 31,25 ng/mL (tabung ke-4), 15,625 ng/mL (tabung ke-5), 7,813 ng/mL (tabung ke-6) dan blangko (tabung ke-7). Dimasukkan 0,3 mL *standard dilution buffer* di dalam tabung pertama hingga tabung ke-7. Selanjutnya ditambahkan 0,3 mL larutan standar 500 ng/mL di dalam tabung pertama dan dihomogenkan dengan *vortex*. Kemudian diambil 0,3 mL dari tabung pertama (larutan standar 250 ng/mL) dan dimasukkan ke dalam tabung 2 dan dihomogenkan, lalu dilanjutkan hingga tabung ke-6. Larutan standar tersebut hanya

digunakan dalam jangka dua jam atau bila disimpan pada suhu 4°C dapat bertahan selama 12 jam atau pada suhu -20°C dapat bertahan selama 48 jam.



Gambar 1. Pengenceran Larutan Standar (10)

c) Penyiapan *biotin-detection antibody working solution*

Penyiapan *biotin-detecting antibody working solution* dapat dilakukan satu jam sebelum pengujian. Volume total *working solution* dihitung yakni 0,05 mL/sumuran × jumlah sumuran. Pengambilan *working solution* ditambahkan 0,1-0,2 mL dari volume total. *Working solution* dibuat dengan perbandingan 1 : 100 yakni 1 µL *biotin-detection antibody* dilarutkan ke dalam 99 µL *Antibody dilution buffer*, lalu dihomogenkan larutan tersebut.

d) Penyiapan SABC *working solution*

HRP-Streptavidin *Conjugate* (SABC) *working solution* disiapkan selama 30 menit pada suhu 37°C sebelum dilakukan prosedur pengujian. Volume total SABC *working solution* dihitung yakni 0,1 mL/sumuran × jumlah sumuran. Pengambilan SABC *working solution* ditambahkan 0,1-0,2 mL dari volume total. SABC diencerkan dengan SABC *dilution buffer* dengan perbandingan 1:100.

e) Penyiapan substrat TMB

Substrat TMB (*tetramethylbenzidine*) disiapkan selama 30 menit pada suhu 37°C sebelum dilakukan prosedur pengujian. Volume total substrat TMB dihitung 0,09 mL/sumuran × jumlah sumuran. Pengambilan substrat TMB ditambahkan 0,1-0,2 mL dari volume total.

2.6.3. Prosedur pengujian

Metode ELISA yang digunakan mengacu pada protokol *Fine Test* (10). Metode ini memiliki prinsip adanya kompetisi antigen target dengan antigen bebas dari sampel, sehingga biotin sebagai antigen target akan berkompetisi dengan malondialdehid pada serum darah untuk berikatan dengan malondialdehid yang menempel pada mikroplate (antibodi primer), selanjutnya berikatan dengan SABC (antibodi sekunder dilabeli enzim), lalu ditambahkan substrat dan terjadi reaksi enzim dengan substrat yang membentuk warna kuning. Reaksi tersebut dihentikan dengan penambahan reagen *stop solution*, sehingga dapat dideteksi menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 405 nm. Tahapan ini disiapkan terlebih dahulu larutan standar, blanko, sampel dan kontrol pada *pre-coated plate*, lalu dicatat posisi pada masing-masing sumurannya. Sebelum ditambahkan standar, blanko, sampel dan kontrol, masing-masing sumuran dicuci terlebih dahulu dengan *wash buffer* sebanyak dua kali, lalu ditambahkan 50 µL larutan standar, blanko, dan sampel serum darah pada setiap sumuran. Blanko sumuran berupa *standard dilution buffer*. Kemudian ditambahkan 50 µL *biotin-detection antibody working solution* pada masing-masing sumuran, lalu ditutupi dengan *plate sealer* yang telah tersedia. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 45 menit. Pencucian dengan 350 µL *wash buffer* pada masing-masing sumuran dan diulangi prosesnya tiga kali. Lalu dibuang sisa *wash buffer* dengan dibalikkan mikroplate dan ditepuk pelan di atas kertas penyerap yang bersih.

Selanjutnya ditambahkan 100 µL SABC *working solution* pada masing-masing sumuran, ditutupi dengan *plate sealer* yang baru, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian pencucian diulangi lagi sebanyak lima kali dengan 350 µL *wash buffer* pada masing-masing sumuran. Tahap selanjutnya ditambahkan 90 µL substrat TMB ke dalam masing-masing sumuran sehingga terjadi reaksi antara enzim dengan substrat, lalu ditutupi dengan *plate sealer* baru. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 15-20 menit. Waktu reaksi dapat dipersingkat atau diperpanjang sesuai dengan perubahan warna yang sebenarnya, namun tidak lebih dari 30 menit. Saat muncul perubahan warna biru pada sumuran, proses reaksi dihentikan dengan menambahkan *stop solution* sebanyak 50 µL ke dalam masing-masing sumuran, sehingga tampak warna berubah menjadi kuning segera. Urutan penambahan *stop solution* dipastikan sama dengan penambahan substrat.

2.7. Metode Analisis

Pengukuran nilai densitas optik (*Optical Density*) MDA ELISA menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Hasil pengukuran densitas optik seri kadar larutan standar diperoleh persamaan $y = b \log x + a$. Nilai densitas optik sampel dimasukkan di dalam persamaan kurva standar diperoleh nilai konsentrasi malondialdehid (ng/mL). Nilai densitas optik sampel berbanding terbalik dengan konsentrasi malondialdehid sebagai parameter lipid peroksida sampel. Pengukuran aktivitas ALT dan AST pada pemodelan hewan dan perlakuan hewan uji dianalisis menggunakan metode optimasi pengujian UV berdasarkan IFCC termodifikasi. Data-data tersebut dianalisis menggunakan uji statistika menggunakan IBM SPSS versi 19 pada taraf kepercayaan 95%(27).

2.8. Pengukuran Berat Organ Relatif (BRO)

Tikus dikorbankan terlebih dahulu dengan dosis anestesi letal menggunakan ketamin (159 mg/kgBB) secara intramuskular setelah jam ke-72. Hewan dipastikan mati dengan memeriksa denyut jantung dan tidak munculnya rasa sakit saat dipegang, kemudian tikus diposisikan rebah dorsal. Organ liver tikus dikeluarkan dari rongga tubuh, dibersihkan dari lemak, dibilas dengan NaCl 0,9% dan ditimbang berat absolut. Perhitungan berat absolut rata-rata liver hewan uji dan BRO pada masing-masing kelompok, disajikan dalam bentuk rata-rata ± simpangan baku dan dianalisis dengan uji statistik dengan program IBM SPSS versi 19 terhadap berat liver tikus dari kelompok percobaan tersebut. Berat relatif organ (BRO) diperoleh rumus menurut Halim *et al.* (12) yakni:

$$BRO = \frac{\text{berat organ liver tikus (g)}}{\text{berat badan tikus (g)}} \times 100$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Preparasi Sampel

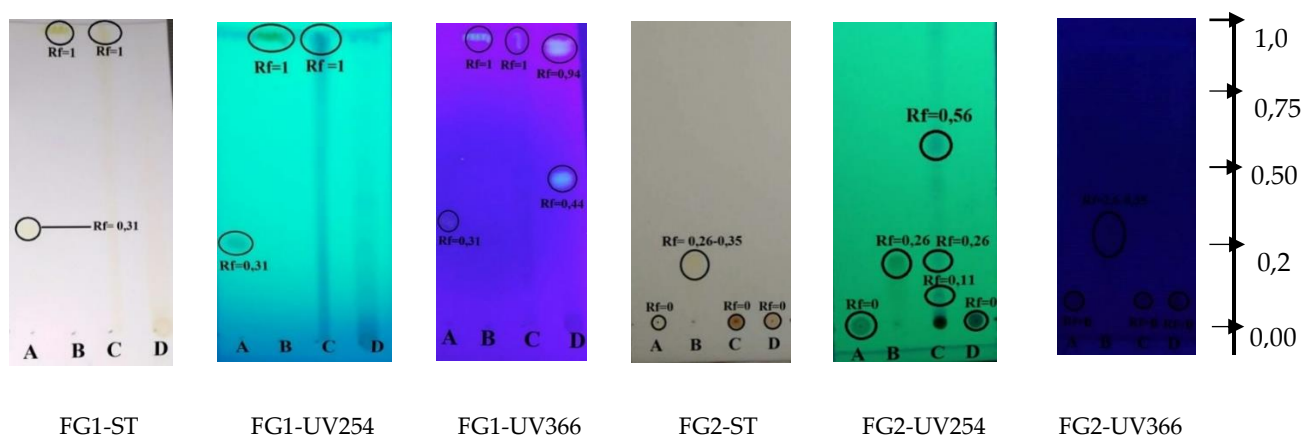
Bagian tanaman yang digunakan untuk penelitian ini adalah daging buah kepel masak. Buah kepel masak diambil langsung dari pohon pada bulan April-Mei 2017 yang diperoleh dari Dusun Mriyan, Seyegan, Sleman pada ketinggian tanah sekitar 165 m dpl dengan ditandai berwarna kuning saat digores pada kulit buah kepel. Pengambilan buah kepel dari satu pohon yang diperoleh 49,240 kg buah, sehingga diperoleh daging buah kepel yang matang sebesar 13,3665 kg dan rendemen sebesar 27,15%. Buah kepel dideterminasi untuk memastikan kebenaran sampel di Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi UGM. Pembuatan ekstrak metanolik daging buah kepel diperoleh melalui proses ekstraksi cara dingin menggunakan metode maserasi dengan pelarut metanol. Hasil maserasi dipekatkan dengan bantuan *vacuum rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak metanolik

kental buah kepel sebesar 107,54 g dan rendemen yang dihasilkan sebesar 0,81 %, serta ekstrak metanolik cair yang tidak dapat menguap sebesar 5,894 L karena kandungan air buah kepel yang besar sehingga digunakan untuk fraksinasi.

Fraksinasi dilakukan menggunakan corong pisah karena metodenya mudah memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat di dalam ekstrak. Pelarut petroleum eter dapat menarik lipid, diklorometan dapat menarik senyawa flavonoid aglikon dan senyawa kurang polar lainnya, serta etil asetat dapat mengambil flavonoid kurang polar seperti isoflavon, flavanon, metil flavon dan flavonol (22). Hasil fraksi etil asetat diperoleh sebesar 40,0848 g, fraksi diklorometan sebesar 12,2850 g dan fraksi petroleum eter daging buah kepel sebesar 26,5069 g. Rendemen fraksi etil asetat, diklorometan dan petroleum eter daging buah kepel diperoleh sebesar 0,30 %, 0,09% dan 0,20 %.

3.2. Identifikasi Kualitatif

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak pertama etil asetat:asam format:asam asetat glasial: air (100:11:11:20 v/v/v) dan fase gerak kedua untuk deteksi flavonoid aglikon menggunakan kloroform : etil asetat (60:40 v/v/v). Hasil elusi KLT disemprot menggunakan pereaksi sitroborat. Reaksi antara sitroborat dengan flavonoid dapat membentuk ikatan kompleks antara hidroksil dengan keton yang bertetangga tahan asam atau dengan kelompok tidak tahan asam ortohidroksil (15). Plat KLT pada fase gerak pertama (FG1) menunjukkan marker rutin ($R_f = 0,31$) dibandingkan fraksi etil asetat ($R_f = 0,44$ dan $0,94$) pada UV 366 nm. Bercak D tampak berpendar berwarna kuning kehijauan, sehingga bercak D kemungkinan dapat dikategorikan dalam kaempferol atau 3- dan 7-O- glikosida lainnya (22). Sedangkan fase gerak kedua (FG2), ekstrak metanolik ($R_f=0,26$) memiliki kepolaran senyawa ini mirip dengan kuersetin ($R_f = 0,26$), sedangkan R_f sebesar 0,11 dan 0,56 dimungkinkan senyawa flavonoid lain jika bercak meredam dengan latar belakang hijau berfluoresensi di bawah sinar UV 254 nm (22) dengan ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Plat KLT dengan Fase Gerak (FG) pada Sinar Tampak (ST), Sinar UV 254 nm, dan Sinar UV 366 nm dengan sampel A= Rutin, B= Kuersetin, C= Ekstrak Metanolik, D= Fraksi Etil Asetat

3.3. Pemodelan Tikus

Pemodelan tikus ditujukan untuk pemilihan dosis CCl_4 yang tepat agar kondisi hepatotoksik pada kerusakan liver akut tanpa disertai kematian hewan uji. Parameter yang digunakan pengujian aktivitas enzim alanin aminotransferase (ALT) dan aspartat aminotransferase (AST). Enzim ALT

sebagai biomarker enzim spesifik liver yang mendeteksi adanya gangguan penyakit liver, sedangkan peningkatan level AST dikaitkan dengan kerusakan otot jantung dan skeletal pada parenkim liver (3). Sampel yang dipilih adalah serum darah karena jumlah enzim aminotransferase lebih besar di dalam sel darah merah (34). CCl₄ disuspensikan dalam minyak zaitun (1:1 v/v) bertujuan memperlambat absorpsi agen toksik tersebut, apabila CCl₄ tanpa pelarut minyak zaitun dapat menyebabkan perubahan struktur dan fungsional poliribosom yang lebih cepat (26). Pada rentang dosis CCl₄ antara 1-2,5 mL dapat menyebabkan hepatotoksik (21), maka dosis CCl₄ dalam minyak zaitun untuk pemodelan tikus sebesar 3, 1,5 dan 0,75 mL/kgBB. Menurut Janakat & Al-Merie (21), kadar toksik CCl₄ diketahui mengalami peningkatan signifikan pada jam ke-2 setelah pemberian CCl₄ secara i.p., sehingga efek maksimalnya terjadi pada jam ke-24, selanjutnya akan mengalami penurunan kadar toksik selama tiga hari. Oleh karena itu, pengambilan serum darah pada jam ke-0, 2, 24, 48 dan 72.

Aktivitas enzim alanin aminotransferase (ALT) merupakan indikator kerusakan liver berdasarkan jumlah berlebihan protein ALT yang diekspresikan (35). Analisis enzim ALT menggunakan uji statistika SPSS untuk setiap jam ke-0, 2, 24, 48 dan 72 dengan membandingkan antar kelompok menunjukkan tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Analisis kedua pengujian enzim ALT pada masing-masing kelompok dengan jam yang berbeda dianalisis menggunakan SPSS. Kelompok tanpa perlakuan tidak mengalami berbeda signifikan ($p > 0,05$) antar jam sehingga tikus yang tidak diberi perlakuan tidak menunjukkan perubahan nilai ALT. Begitu pula pada dosis 3 dan 0,75 mL/kgBB menunjukkan nilai ALT tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) seiring perubahan jamnya. Akan tetapi, dosis 1,5 mL/kgBB menunjukkan nilai ALT berbeda signifikan ($p < 0,05$) karena terjadi peningkatan mulai jam ke-0 hingga jam ke-2 sebesar 21 %, lalu menurun signifikan pada jam ke-2 hingga jam ke-48 sebesar 91,2 %. Dapat disimpulkan CCl₄ pada dosis 1,5 mL/kgBB dapat berpotensi mempengaruhi perubahan nilai ALT selama 72 jam dibandingkan dosis lainnya. Data hasil pengukuran enzim ALT pada kelompok pemodelan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Nilai ALT pada Pemberian CCl₄ Dosis Bertingkat

Dosis (ml/kgBB)	Perlakuan jam ke- (U/I)				
	0	2	24	48	72
TP	51,37 ± 10,84	44,23 ± 7,46	36,67 ± 14,15	39,67 ± 7,24	38,43 ± 12,18
3	43,16 ± 13,91*	53,88 ± 7,22*	48,22 ± 10,02*	49,50 ± 21,39*	43,24 ± 4,31*
1,5	57,84 ± 5,70*#	70,00 ± 27,75*#	48,20 ± 11,19*#	36,62 ± 6,40*#	41,22 ± 11,64*#
0,75	53,58 ± 7,50*	53,84 ± 12,97*	54,18 ± 10,55*	43,26 ± 12,15*	41,36 ± 10,91*

* nilai rata-rata ± simpangan baku (n=5/kelompok), kecuali tanpa perlakuan (TP) (n=3/kelompok), # $p < 0,05$ dibandingkan pada kelompok sama, ^ $p < 0,05$ dibandingkan pada jam sama

Peningkatan aktivitas enzim aspartat aminotransferase (AST) dikaitkan dengan adanya kerusakan pada parenkim liver (3), karena CCl₄ dimetabolisme oleh sitokrom P₄₅₀ menjadi triklorometil radikal memicu kerusakan sel parenkim akibat aktivasi sel Kupffer dan dapat melepaskan enzim-enzim sel di dalam peredaran darah (9). Analisis statistika data AST berdasarkan pengambilan sampel pada jam yang sama diperoleh sampel jam ke-0 menunjukkan data berbeda signifikan $p < 0,05$ yakni kelompok dosis 3 mL/kgBB dengan dosis 1,5 mL/kgBB, kelompok dosis 0,75 mL/kgBB dengan tanpa perlakuan dan kelompok 1,5 mL/kgBB dengan tanpa perlakuan. Hal ini

dapat disebabkan adanya peningkatan kadar hepatotoksin CCl₄ pada kedua dosisnya, namun berbeda dengan kelompok dosis 3 mL/kgBB yang belum menunjukkan peningkatan kadar AST di dalam serum darah karena dapat dimungkinkan pelarut minyak zaitun dapat memperlambat agen toksik tersebut (26). Pengambilan sampel jam ke-2, ke-24 dan ke-48 menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan ($p>0,05$) antar data kelompok. Pengambilan sampel jam ke-72 dianalisis melalui uji *One Way* ANOVA dan uji Scheffe menunjukkan data antar kelompok berbeda signifikan yakni antara dosis 3 mL/kgBB sebesar 3,5 kali lebih besar dibandingkan tanpa perlakuan, dosis 1,5 mL/kgBB sebesar 3,8 kali lebih besar dibandingkan tanpa perlakuan, dan dosis 0,75 mL/kgBB lebih besar 3,4 kali lebih besar dibandingkan tanpa perlakuan. Hal tersebut menunjukkan hewan uji yang diinduksi CCl₄ dengan berbagai dosis mengalami peningkatan AST dibandingkan tanpa perlakuan. Data hasil pengukuran enzim AST pada kelompok pemodelan disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 2. Nilai AST pada Pemberian CCl₄ Dosis Bertingkat

CCl ₄ (ml/kgBB)	Perlakuan jam ke- (U/I)				
	0	2	24	48	72
TP	92,77 ± 3,64*	127,23 ± 25,93	72,63 ± 19,96	127,00 ± 19,96	23,83 ± 5,30*
3	107,98 ± 18,30*	177,28 ± 41,63*	191,66 ± 73,22*	132,56 ± 33,21*	107,48 ± 9,95*#
1,5	168,74 ± 70,88*#	392,84 ± 337,68*	204,96 ± 143,48*	110,82 ± 41,48*	113,20 ± 45,87*#
0,75	141,54 ± 25,39*#	241,12 ± 138,75*	226,08 ± 61,83*	130,90 ± 34,76*	104,84 ± 21,33*#

* nilai rata-rata ± simpangan baku (n=5/kelompok), kecuali tanpa perlakuan (TP) (n=3/kelompok),

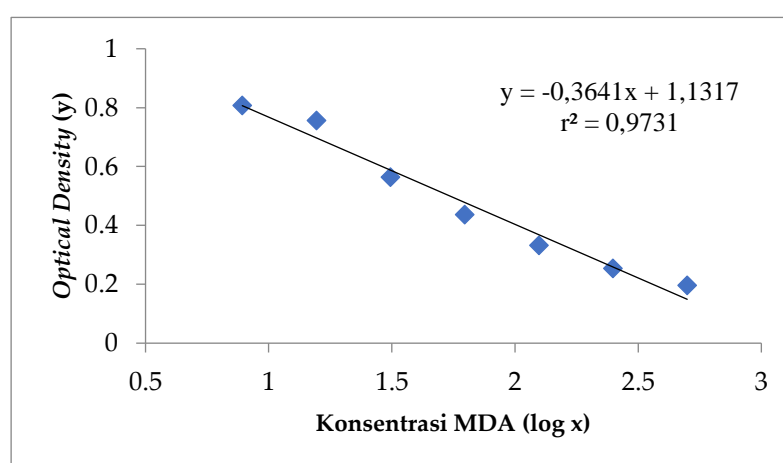
nilai signifikan $p < 0,05$ dibandingkan tanpa perlakuan.

Berdasarkan data ALT menunjukkan dosis 1,5 mL/kgBB berbeda signifikan daripada dosis lainnya, sedangkan data AST menunjukkan ketiga dosis mengalami peningkatan kadar AST dibandingkan tanpa perlakuan, maka dapat disimpulkan bahwa pemodelan tikus ini untuk dosis yang tepat digunakan dosis 1,5 ml/kgBB karena dapat menyebabkan hepatotoksik pada tikus namun tidak mematikan hewan uji.

3.4. Pemeriksaan Sampel Darah

Tikus diinduksi CCl₄ sebagai hepatotoksin dapat memproduksi kelebihan lipid peroksida yang diisolasi dari serum darah tikus dan dideteksi menggunakan MDA ELISA sehingga diperoleh kurva standar $y = -0,3641x + 1,1317$ dengan linearitas (r) sebesar 0,9875 ($r^2 = 0,9731$) sesuai pada gambar 3. Standar kurva penelitian dapat dikatakan reliabel jika regresi linear memiliki nilai r^2 lebih dari 0,97 (24). Densitas optik sampel dikonversikan menjadi konsentrasi MDA ($\mu\text{g}/\text{mL}$), karena nilai densitas optik sampel yang diperoleh berbanding terbalik dengan konsentrasi malondialdehid sebagai parameter lipid peroksida masing-masing sampel. Hasil analisis malondialdehid (MDA) dengan uji statistika diketahui perbandingan kelompok berbeda pada jam yang sama (ke-24, ke-48 dan ke-72) tidak berbeda signifikan ($p>0,05$). Perbandingan kedua antara kelompok yang sama pada jam berbeda, kelompok tanpa perlakuan tidak berbeda signifikan ($p>0,05$) antar jam karena tidak diberikan perlakuan. Konsentrasi MDA pada kelompok kontrol pelarut CMCNa 0,1 % menurun secara signifikan ($p<0,05$) sebesar 58,9 % (24 ke 72) dan 58,2% (48 ke 72). Kelompok CCl₄ menurun

secara signifikan ($p < 0,05$) sebesar 52,6% (24 ke 48) dan sebesar 81,8% (48 ke 72). Puncak peningkatan dosis hepatotoksik induksi CCl_4 pada jam ke-24, lalu kembali normal setelah hari ke-3 (21). Vitamin C dapat menangkal radikal bebas sehingga menurunkan lipid peroksida secara in vivo (14). Hasil konsentrasi MDA pada kelompok vitamin C menurun antar jam walaupun tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$). Pemberian ekstrak metanolik menunjukkan penurunan konsentrasi MDA antar jam secara signifikan ($p < 0,05$) sebesar 41,3% (24 ke 48) dan sebesar 71,6% (48 ke 72), sedangkan pemberian fraksi etil asetat tidak menunjukkan perbedaan signifikan ($p > 0,05$) antar jam, hal ini disebabkan ekstrak metanolik memiliki hasil sinergisme dari beberapa senyawa ekstrak, sedangkan proses pemisahan fraksinasi menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan (32).



Gambar 3. Grafik Kurva Standar Malondialdehid

Tabel 3. Konsentrasi Malondialdehid Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Konsentrasi Malondialdehid (ng/mL)		
	Jam ke-24	Jam ke-48	Jam ke-72
Tanpa perlakuan	108,14 ± 35,61*	95,98 ± 68,56*	28,42 ± 2,04*
Kontrol pelarut	150,14 ± 66,93*#	147,68 ± 43,51*#	61,76 ± 24,66*#
Ekstrak metanolik	168,70 ± 42,89*#	98,96 ± 24,19*#	28,15 ± 14,52*#
Fraksi etil asetat	124,17 ± 52,82*	182,27 ± 82,95*	55,81 ± 63,26*
Vitamin C	112,84 ± 65,04*	111,02 ± 85,72*	36,00 ± 35,59*
CCl_4	155,19 ± 124,65*#	73,64 ± 39,36*#	13,40 ± 13,99*#

* nilai rata-rata ± simpangan baku (n=4/kelompok), # $p < 0,05$ dibandingkan pada kelompok sama,

^ $p < 0,05$ dibandingkan pada jam sama

Enzim alanin aminotransferase (ALT) dan enzim aspartat aminotransferase (AST) merupakan biomarker enzim spesifik untuk deteksi penyakit liver (3). Data ALT menunjukkan tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) dengan perbandingan antar kelompok berbeda pada jam yang sama (jam ke-0, ke-24 dan ke-72). Analisis statistika kedua pada jam berbeda di dalam kelompok sama, ALT pada kelompok tanpa perlakuan, kontrol pelarut, fraksi etil asetat, vitamin C dan CCl_4 tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$), sedangkan terjadi fluktuatif pada ekstrak metanolik. Analisis AST berdasarkan

kelompok berbeda pada jam yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan pada jam ke-0 dan jam ke-72, namun berbeda signifikan pada jam ke-24 antara kelompok tanpa perlakuan dibandingkan dengan kelompok ekstrak metanolik, fraksi etil asetat dan vitamin C, serta antara kelompok kontrol pelarut dibandingkan dengan kelompok ekstrak metanolik, fraksi etil asetat, vitamin C dan CCl₄. Kelompok CCl₄ tidak berbeda signifikan dengan tanpa perlakuan karena induksi CCl₄ belum menyebabkan gangguan liver.

Analisis statistika antar jam yang berbeda pada kelompok yang sama menunjukkan data kelompok tanpa perlakuan dan kontrol pelarut tidak berbeda signifikan nilai AST antar jam. Pada kelompok CCl₄ menunjukkan peningkatan nilai AST sebesar 38,7% (0 ke 24) dan penurunan nilai AST sebesar 38,7% (24 ke 72). Menurut Janakat & Al-Merie (21), pemberian CCl₄ secara i.p. mengalami puncak peningkatan dosis hepatotoksik pada jam ke-24, dan akan menurun setelah hari ketiga. Kelompok ekstrak metanolik, fraksi etil asetat dan vitamin C mengalami perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar jam dengan menunjukkan peningkatan AST seiring peningkatan toksik pada CCl₄ secara berurutan sebesar 97,3%, 54,5% dan 99,0% pada jam ke-24 dan menurun sebesar 28%, 29,9% dan 45,5% pada jam ke-72

Tabel 4. Aktivitas Enzim ALT dan AST pada Perlakuan Hewan Uji

Kelompok	Aktivitas Enzim ALT (U/I)			Aktivitas Enzim AST (U/I)		
	Jam ke-0	Jam ke-24	Jam ke-72	Jam ke-0	Jam ke-24	Jam ke-72
TP	53,80 ± 5,84*	51,50 ± 4,03*	53,53 ± 6,98*	101,55 ± 17,66*	124,50 ± 20,43*	97,48 ± 29,31*
Kontrol pelarut	51,20 ± 7,13*	49,35 ± 10,97*	52,90 ± 11,47*	103,90 ± 10,73*	122,68 ± 26,09*	116,50 ± 40,21*
EM	50,10 ± 3,96**	58,15 ± 5,08**	45,15 ± 5,39**	91,93 ± 39,96**	181,40 ± 23,32**^s	130,68 ± 14,86**
Fraksi EA	48,85 ± 10,33*	46,20 ± 6,18*	48,08 ± 9,75*	111,05 ± 12,62**	171,63 ± 22,05**^s	120,38 ± 34,37**
Vitamin C	54,98 ± 4,47*	55,15 ± 11,86*	52,85 ± 11,49*	123,10 ± 56,67**	244,93 ± 74,69**^s	133,48 ± 60,62**
CCl ₄	46,33 ± 5,52*	51,10 ± 11,22*	48,20 ± 10,72*	127,65 ± 17,65**	173,25 ± 50,92**^s	106,18 ± 29,92**

* nilai rata-rata ± simpangan baku (n=4/kelompok), # $p < 0,05$ dibandingkan pada kelompok sama,

^ $p < 0,05$ dibandingkan pada jam sama

3.5. Pemeriksaan Sampel Organ

Liver adalah organ yang berfungsi untuk metabolisme dan ekskresi. BRO merupakan parameter kerusakan liver akibat paparan CCl₄ ditandai peningkatan berat liver karena akumulasi lemak. Berat Relative Organ (BRO) liver adalah perbandingan antara berat liver dengan berat hewan uji x 100% (19). Sel memiliki kemampuan untuk adaptasi terhadap kondisi yang tidak menguntungkan, baik secara struktur atau fisiologi, namun paparan toksin dengan dosis tertentu mampu menimbulkan perubahan fisiologi yang dapat bersifat reversibel (25). Data berat relatif organ liver disajikan dalam Tabel 5.

Tabel 5. Berat Relatif Organ Liver Hewan Uji

Kelompok	Berat badan tikus sebelum perlakuan (g)	Berat badan tikus sesudah perlakuan (g)	Berat liver (g)	BRO (g/100 g)
Tanpa Perlakuan	139,25 ± 6,82*	138,28 ± 3,98*	5,22 ± 0,27*	3,77 ± 0,16* [#]
Kontrol pelarut	153,98 ± 6,18*	149,58 ± 3,86*	5,99 ± 0,72*	4,00 ± 0,40* [#]
Ekstrak metanolik	139,30 ± 7,55*	130,23 ± 7,27*	5,27 ± 0,45*	4,05 ± 0,18* [#]
Fraksi etil asetat	143,55 ± 6,64*	141,25 ± 10,33*	5,72 ± 0,31*	4,05 ± 0,12* [#]
Vitamin C	118,53 ± 0,89*	113,95 ± 4,50*	4,80 ± 0,53*	4,20 ± 0,30*
CCl ₄	114,88 ± 2,80*	112,08 ± 7,02*	5,06 ± 0,47*	4,51 ± 0,27*

*nilai rata-rata ± simpangan baku (n=4/kelompok), [#] nilai signifikan p < 0,05 dibandingkan CCl₄

Berdasarkan pada Tabel 5, hasil BRO liver tertinggi pada kelompok CCl₄ (4,51 ± 0,27 g/100 g) dan BRO liver terendah pada tanpa perlakuan (3,77 ± 0,16 g/100g). Analisis statistika menunjukkan data BRO homogen dan terdistribusi normal. Berdasarkan uji One Way ANOVA menunjukkan BRO antar kelompok berbeda signifikan (p<0,05). Berdasarkan uji LSD, terdapat perbedaan kondisi BRO antara kelompok CCl₄ dengan kelompok tanpa perlakuan, kontrol pelarut, ekstrak metanolik, dan fraksi etil asetat, namun antara kelompok vitamin C dengan CCl₄ tidak berbeda signifikan (p>0,05). Kelompok vitamin C mengalami peningkatan BRO liver dibandingkan tanpa perlakuan. Peningkatan BRO liver secara signifikan (p<0,05) menunjukkan terjadi degenerasi pada liver akibat senyawa toksin CCl₄ terjadi pada kelompok CCl₄ dan vitamin C.

4. KESIMPULAN

Ekstrak metanolik memiliki kepolaran mirip (Rf=0,26) dengan kuersetin dan fraksi etil asetat daging buah kepel menunjukkan adanya golongan flavonoid lain. Ekstrak metanolik dapat menurunkan konsentrasi lipid peroksida dan profil kerusakan liver (AST dan ALT) dibandingkan fraksi etil asetat seiring dengan nilai BRO ekstrak metanolik dan fraksi etil asetat yang lebih rendah dibandingkan BRO CCl₄.

Ucapan terima kasih: Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Kementerian Riset dan Teknologi serta Kementerian Pendidikan dan kebudayaan yang telah membiayai penelitian ini.

Referensi

1. Anonim. *Farmakope Herbal Indonesia Edisi I*; Departemen Kesehatan Republik Indonesia; Jakarta, 2008.
2. Anonim. ALAT (GPT) FS* (IFCC mod.) with/without Pyridoxal-5-Phosphate: Diagnostic Reagent for Quantitative In Vitro Determination of ASAT(GOT) in Serum or Plasma on Photometric Systems, *DiaSys Diagnostic Systems GmbH*, 2009.
3. Anonim. ASAT (GOT) FS* (IFCC mod.) with/without Pyridoxal-5-Phosphate: Diagnostic Reagent for Quantitative In Vitro Determination of ASAT(GOT) in Serum or Plasma on Photometric Systems, *DiaSys Diagnostic Systems GmbH*, 2013.
4. Anonim. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinis Secara In Vivo*; Badan POM; Jakarta, 2014, 20-21.

5. Batubara, I.; Darusman, L.K.; Djauhari, E.; Mitsunaga, T. Potency of Kepel (*Stelechocarpus burahol*) as Cyclooxygenase-2 Inhibitor. *The Journal of Indonesian Medicinal Plant*, 2010, 3(2): 110-114.
6. Cannel, R.J.P. Natural Products Isolation 2nd Edition. *Humana Press Inc*: Totowa, New Jersey, 2006, 347-350, 357.
7. Cutler, R.G.; Rodriguez, H. Critical Review of Oxidative Stress and Aging: Advances in Basic Science, Diagnostic and Intervention. World Scientific; Singapore, 2003, Volume 2, 870-880.
8. Darusman, H.S.; Rahminiwati, M.; Sadiyah, S.; Batubara, I.; Darusman, L.K.; Mitsunaga, T. Indonesian Kepel Fruits (*Stelechocarpus burahol*) as Deodorant. *Research Journal of Medical Plant*, 2012, 6, 2, 180-188.
9. Edwards, M. J.; Keller, B.J.; Kauffman, F.C.; Thurman, R.G., The Involvement of Kupffer Cells in Carbon Tetrachloride Toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993, 119, 275-279.
10. Fine Test. MDA (Malondialdehyde) ELISA Kit, <https://www.fn-test.com/elisa/universal/mda-malondialdehyde-elisa-kit-elisa-kit/>, 2017, 22 November 2017 pukul 23:08 WIB.
11. Ghozali, Imam, 2011, *Aplikasi Analisis Multivariate dengan Program IBM SPSS 19*; Badan Penerbit Universitas Diponegoro; Semarang.
12. Halim, S.Z.; Abdullah, N.R.; Afzan, A.; Rashid, B.A.A.; Jantan, I.; Ismail, Z. Acute Toxicity Study of Carica Papaya Leaf Extract in Sprague Dawley Rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5, 1867-1872.
13. Halliwell, B.; Zhao K.; Whiteman M. The Gastrointestinal Tract: A Major Site of Antioxidant Action? *Free Radical Research*, 2000, 33, 819-830.
14. Halliwell, B. Vitamin C and Genomic Stability, *Mutation Research*, 2001, 475, 29-35.
15. Hamidu, L.; Ahmad, A.R.; Najib, A. Qualitative and Quantitative Test of Total Flavonoid Buni Fruit (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) with UV-Vis Spectrophotometry Method. *Pharmacognosy Journal*, 2018, 10, 1, 60-63.
16. Haryjanto, L. Konservasi Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook.f Thomson): Jenis yang telah Langka, *Mitra Hutan Tanaman*, 2012, 7, 1, 11-17.
17. Hatmi, R.U.; Widyayanti S.; Sudarmaji. Potensi Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook.F & Th.) sebagai Sumber Pangan Fungsional. *Prosiding Seminar Nasional Sumber Daya Genetik Pertanian*, 2015, 248-257.
18. Heriyanto, N.M.; Garsetiasih, R. Kajian Ekologi Pohon Burahol (*Stelechocarpus burahol*) di Taman Nasional Meru Betiri, Jawa Timur. *Buletin Plasma Nutfah*, 2005, 11, 2, 65-73.
19. Huo, H.Z.; Wang, B.; Liang, Y.K.; Bao, Y.Y.; Gu, Y. Hepatoprotective and Antioxidant Effects of Licorice Extract against CCl₄-Induced Oxidative Damage in Rats. *International Journal Molecular Sciences*, 2011, 12, 6529-6543.
20. Ighodaro, O.M.; Akinloye, O.A. First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx): Their Fundamental Role in The Entire Antioxidant Defence Grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 2017.
21. Janakat, S.; Al-Merie, H. Optimization of The Dose and Route of Injection and Characterisation of The Time Course of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in The Rat. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2002, 48, 41- 44.
22. Markam, K.R.; Andersen, O.M. *Flavonoids : Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press; Taylor & Francis Group; LLC, 2006, 2, 11-12,.
23. Nasir, H. N. Uji Aktivitas Antioksidan In Vitro Daging Buah Kepel (*Stelecocarpus burahol* (Blume) Hook. F. & Thomson) dan Penentuan Struktur Kimia Senyawa Aktifnya. *Tesis*. Pasca Sarjana; Prodi Ilmu Farmasi; Universitas Gadjah Mada; Yogyakarta, 2007.

24. Natarajan, S.; Remick, D.G. The ELISA Standard Save: Calculation of Sample Concentrations in Assays with A Failed Standard Curve. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 336, 242–245.
25. Nurawanti; Soekanto, A. Pengaruh Paparan Uap Anti Nyamuk Elektrik Kandungan Allethrin terhadap Berat dan Warna Liver Tikus. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*, 2015, 6, 2, 6–13.
26. Rao, K.S.; Recknagel, R.O. Early Onset of Lipoperoxidation in Rat Liver After Carbon Tetrachloride Administration. *Experimental and Molecular Pathology*, 1968, 9, 271-278.
27. Razali, N.M.; Wah, Y.B. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling Tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2011, 2, 1, 21-33.
28. Sakamoto S.; Putalun W.; Vimolmangkang S.; Phoolcharoen W.; Shoyama Y.; Tanaka, H.; Morimoto, S. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for The Quantitative/ Qualitative Analysis of Plant Secondary Metabolites, *Journal of Natural Medicines*, 2018, 72, 32-42.
29. Sumartini. Studi Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik dalam Daging Buah Kepel (*Stelechocarpus burahol*). Tesis; Airlangga University Library; Surabaya, 2011.
30. Sunardi, C.; Sumiwi, S.A.; Hertati, A. Penelitian Antiimplantasi Ekstrak Etanol Daging Buah Burahol (*Stelechocarpus Burahol* Hook F. & Thomson) pada Tikus Putih. *Majalah Ilmu Farmasi*, 2010, 7, 1, 1-8.
31. Sunarni, T.; Pramono, S.; Asmah, R. Antioxidant–Free Radical Scavenging of Flavonoid from The Leaves of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th., *Majalah Farmasi Indonesia*, 2007, 18, 3, 111-116.
32. Tisnadjaja, D.; Saliman, E.; Silvia; Simanjuntak, P. Pengkajian Burahol (*Stelechocarpus burahol* (Blume) Hook & Thomson) sebagai Buah yang Memiliki Kandungan Senyawa Antioksidan. *Biodiversitas*, 2006, 7, 2, 199-202.
33. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39, 44-48.
34. Vroon, D.H.; Israili, Z. Aminotransferases, In: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors, *Clinical Method: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 3rd edition, Boston: Butterworths, 1990, Chapter 99.
35. Yang, R-Z.; Park, S.; Reagan, W.J.; Goldstein, R.; Zhong, S.; Lawton, M.; Rajamohan, F.; Qian, K.; Liu, L.; Gong, D-W. Alanine Aminotransferase Isoenzymes: Molecular Cloning and Quantitative Analysis of Tissue Expression in Rats, and Serum Elevation in Liver Toxicity. *Hepatology*, 2009, 49, 2, 598–607.



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).