

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Determinasi Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata* Linn.)

Determinasi tumbuhan kirinyuh (*Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob.) telah dilakukan di Herbarium ANDALAS Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Andalas untuk memberikan keterangan mengenai kebenaran identitas simplisia yang digunakan. Hasil determinasi tumbuhan yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Chromolaena odorata* (L.) R. M. King & H. Rob. dari famili Compositae seperti yang tertera pada surat No. 148/K-ID/ANDA/IV/2018. Surat determinasi diberikan dalam bentuk sertifikat yang dapat dilihat pada Lampiran 19.

4.2 Preparasi Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol daun kirinyuh yang digunakan adalah daun yang sudah dalam bentuk simplisia. Daun kirinyuh dalam bentuk simplisia diblender untuk memperkecil ukuran partikel dan memperluas permukaan serbuk sehingga dapat menyari metabolit sekunder dalam serbuk lebih banyak. Serbuk simplisia daun kirinyuh kemudian ditimbang yang bertujuan untuk menghitung jumlah rendemen yang dihasilkan.

Ekstraksi daun kirinyuh dilakukan dengan metode maserasi karena merupakan ekstraksi cara dingin sehingga dapat digunakan untuk zat yang tidak tahan pemanasan seperti flavonoid serta alatnya sederhana. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol yang merupakan pelarut universal karena dapat menyari komponen polar maupun non polar (Harborne, 1987). Perbandingan air dengan etanol yang sesuai akan mempermudah difusi komponen

keluar sel, sehingga dipilih etanol 96% dikarenakan semakin besar jumlah etanol maka lebih efisien dalam mendegradasi dinding sel yang bersifat non polar sehingga polifenol akan tersari lebih banyak (Tiwari *et al.*, 2011).

Proses maserasi dilakukan dengan merendam 2 kg serbuk simplisia daun kirinyuh kedalam 16 L pelarut etanol 96% yang telah didestilasi sebelumnya selama 3 x 24 jam. Remaserasi dilakukan selama 2 x 24 jam dengan menggunakan 10 L pelarut etanol 96% untuk mendapatkan senyawa yang lebih banyak. Maserat dipisahkan dari pelarutnya dengan cara disaring dengan kertas Whatman. Filtratnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dengan prinsip vakum destilasi sehingga tekanan dari *rotary evaporator* akan menurun dan pelarut akan menguap dibawah titik didihnya sehingga tidak merusak senyawa yang terdapat dalam ekstrak, kemudian diperoleh ekstrak kental dari daun kirinyuh. Ekstrak kental dari daun kirinyuh kemudian dipekatkan dalam oven dengan suhu 40°C.

Jumlah ekstrak etanol 96% daun kirinyuh didapat sebanyak 321,79 g dengan rendemen sebesar 16,08%. Nilai rendemen ekstrak etanol 96% daun kirinyuh yang didapat cukup besar dan tidak jauh berbeda pada penelitian Nurhalimah (2014), yang mendapat rendemen sebesar 17,89%. Besar kecilnya nilai rendemen ekstrak menunjukkan efektivitas proses ekstraksi yang dapat dipengaruhi oleh ukuran serbuk simplisia, jenis pelarut yang digunakan, dan waktu ekstraksi. Perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 12.

4.3 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi metabolit yang terkandung dalam daun kirinyuh dan ekstrak daun kirinyuh. Pengujian ini bersifat

kualitatif dengan melihat warna, endapan, maupun busa dari larutan yang direaksikan terhadap sampel. Uji skrining fitokimia dilakukan terhadap simplisia dan ekstrak etanol daun kirinyuh. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun kirinyuh dapat dilihat pada Tabel 12.

Tabel 4. Data hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun kirinyuh

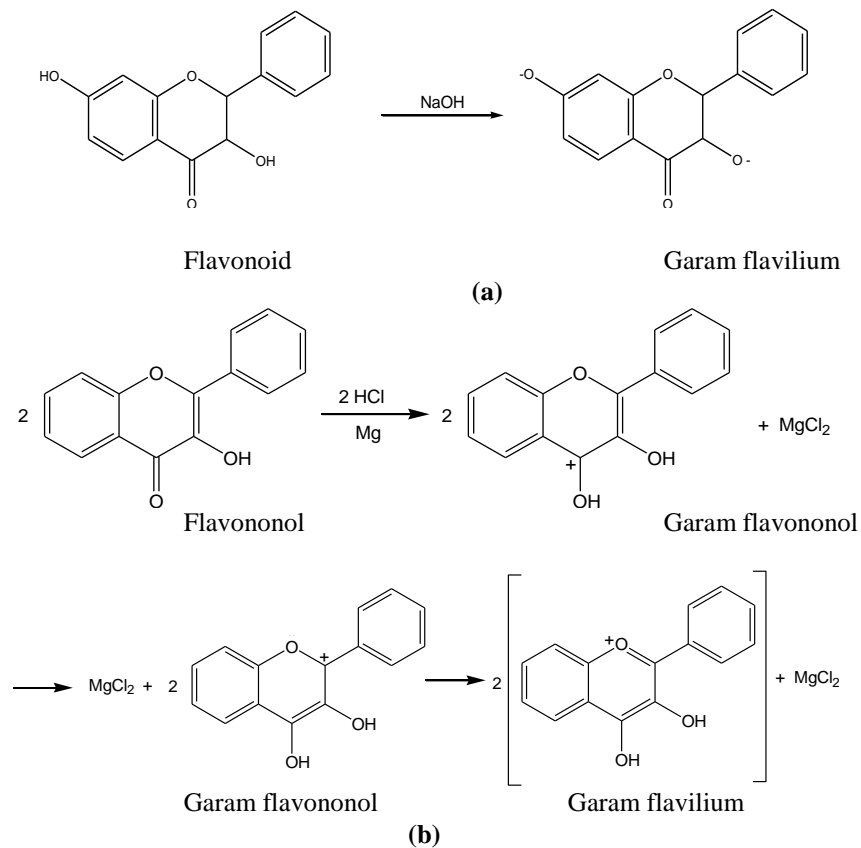
Metabolit Sekunder	Hasil
Flavonoid	
- NaOH	+
- HCl + Mg	+
Alkaloid	
- Mayer	+
- Wagner	+
- Dragendorff	+
Tanin	+
Fenolik	+
Saponin	+
Steroid	+
Triterpenoid	-

Keterangan: (+): Terdeteksi (-): Tidak terdeteksi

Hasil data pada Tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kirinyuh memberikan reaksi positif pada pengujian flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, saponin, dan steroid, namun memberikan reaksi negatif pada triterpenoid. Hasil positif dari skrining fitokimia ekstrak dengan menggunakan reagen terlihat dengan terjadinya perubahan warna, terbentuknya buih, dan terbentuknya lapisan cincin pada larutan uji. Hasil skrining fitokimia ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 13.

Percobaan uji flavonoid pada penelitian ini memberikan perubahan warna dari warna hijau menjadi warna merah jingga ketika ekstrak direaksikan dengan NaOH maupun direaksikan dengan HCl + Mg. Perubahan warna tersebut menunjukkan bahwa ekstrak positif mengandung flavonoid. Menurut Sirait (1987), hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi merah jingga karena flavonoid memberikan karakteristik warna merah, oranye, dan

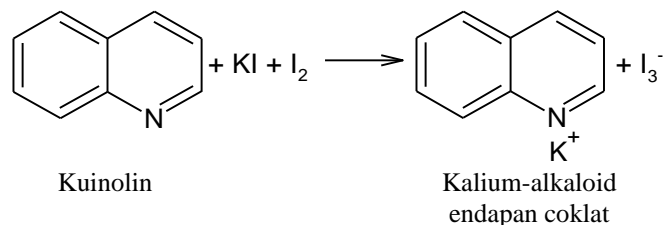
kuning. Reaksi uji Wilstater dan NaOH 10% dengan flavonoid dapat dilihat pada Gambar 5.



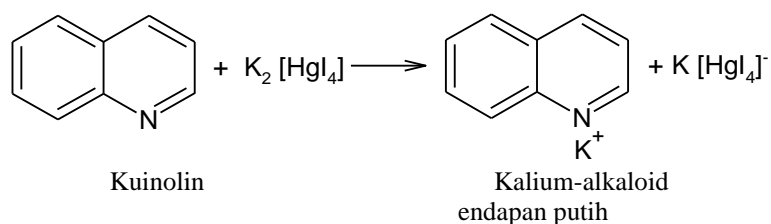
Gambar 5. Reaksi senyawa flavonoid (a) dengan NaOH dan (b) dengan HCl + Mg (Marliana dkk., 2005)

Identifikasi alkaloid pada simplisia dan ekstrak etanol daun kirinyuh positif karena menghasilkan endapan berwarna, namun endapan yang dihasilkan relatif sedikit yang menandakan kandungan alkaloid juga sedikit. Simplisia dan ekstrak ditambah asam klorida dan dipanaskan. Penambahan asam klorida bertujuan untuk mengekstrak alkaloid karena alkaloid bersifat basa sehingga disari dengan pelarut yang mengandung asam (Marliana dkk., 2005). Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan adanya endapan coklat muda sampai kuning. Atom nitrogen pada alkaloid membentuk ikatan kovalen dengan ion logam K⁺ pada reagen Wagner membentuk kompleks kalium-alkaloid yang

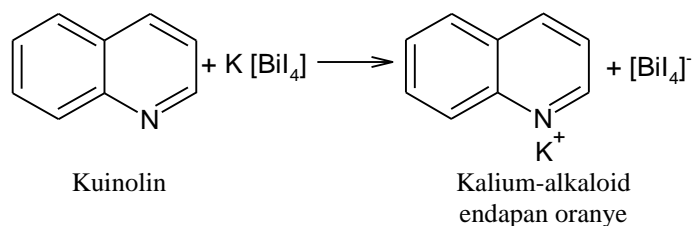
mengendap dan berwarna coklat dari I_3 . Reaksi yang terjadi pada uji Wagner ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi alkaloid dengan reagen Wagner (Marliana dkk., 2005)



Gambar 7. Reaksi alkaloid dengan reagen Mayer (Marliana dkk., 2005)

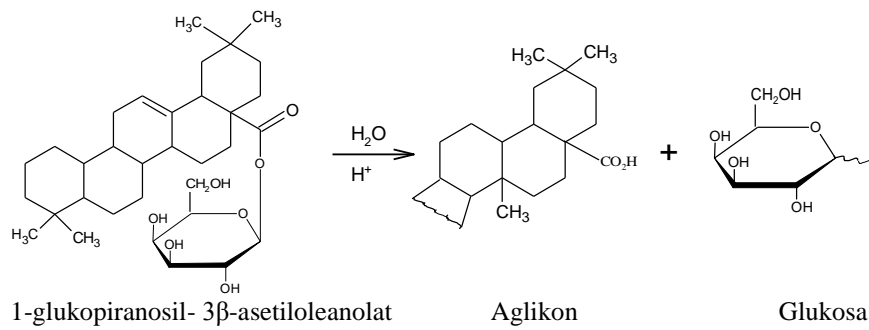


Gambar 8. Reaksi alkaloid dengan reagen Dragendorff (Marliana dkk., 2005)

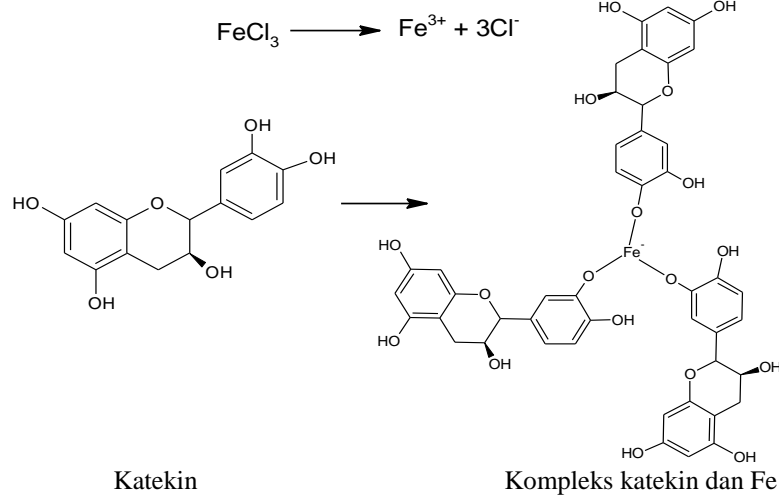
Hasil positif alkaloid dengan pereaksi Mayer ditandai dengan adanya endapan putih. Atom nitrogen pada alkaloid bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada Gambar 7. Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium-alkaloid. Nitrogen dari alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 8.

Hasil identifikasi saponin pada simplisia dan ekstrak etanol daun kirinyuh menghasilkan busa yang dapat bertahan selama 10 menit dan saat penambahan asam klorida buih tersebut tidak hilang yang berarti simplisia dan

ekstrak etanol daun kirinyuh positif mengandung saponin. Buah yang dihasilkan dari uji saponin merupakan tanda dari glikosida yang terhidrolisis menjadi aglikon dan glukosa. Reaksi pembentukan busa pada uji saponin ditunjukkan pada Gambar 9.



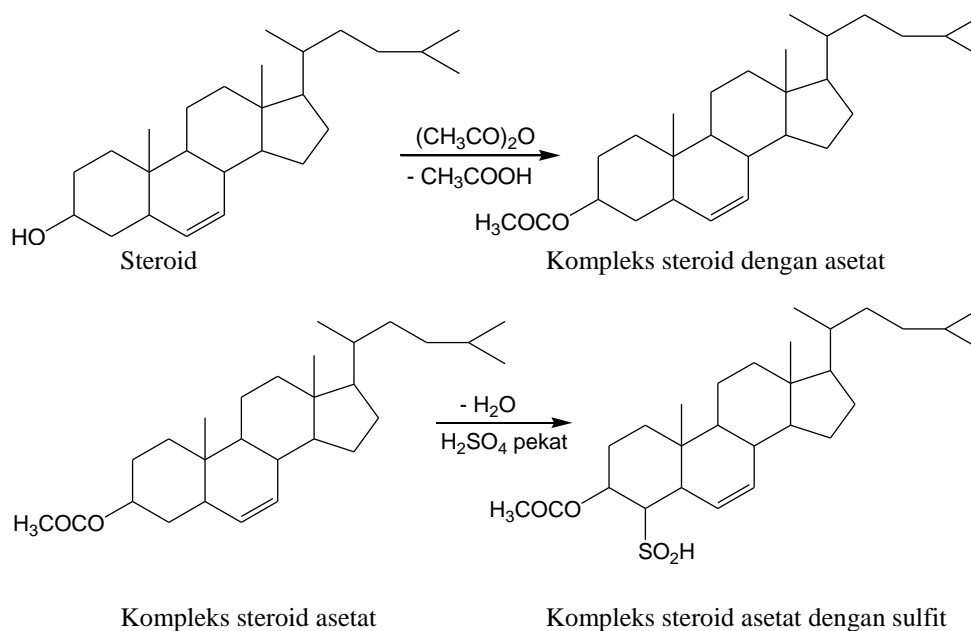
Gambar 9. Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Marliana dkk., 2005)



Gambar 10. Reaksi senyawa fenolik dan FeCl₃(Latifah, 2015)

Identifikasi senyawa fenolik dan tanin dilakukan dengan cara menambahkan reagen FeCl₃ ke dalam sampel. Penambahan FeCl₃ bertujuan untuk menentukan adanya gugus fenol dalam sampel tersebut. Hasil identifikasi simplisia dan ekstrak etanol daun kirinyuh positif mengandung tanin dan senyawa fenolik yang ditandai dengan perubahan warna menjadi hitam. Terbentuknya warna hitam dikarenakan tanin maupun senyawa fenolik akan membentuk

senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Latifah, 2015). Reaksi pembentukan kompleks dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 11. Mekanisme reaksi senyawa steroid dengan Liebermann-Burchard (Setiabudi dan Tukiran, 2017)

Pengujian triterpenoid dan steroid pada penelitian ini menggunakan uji Liebermann-Burchard (asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat) yang menghasilkan perubahan warna. Ekstrak etanol daun kirinyuh positif mengandung senyawa steroid karena terbentuknya warna hijau setelah direaksikan, namun memberikan hasil yang negatif terhadap triterpenoid karena tidak memberikan warna merah. Terbentuknya warna hijau dikarenakan terjadinya oksidasi pada golongan senyawa steroid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi.

Prinsip reaksi uji terpenoid dan steroid yaitu kondensasi atau pelepasan H_2O dan penggabungan karbokation, reaksi diawali dengan proses asetilasi gugus hidroksil menggunakan anhidrida asetat. Reaksi antara steroid atau triterpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard akan menyebabkan terbentuknya warna yang spesifik sesuai dengan senyawa yang berikatan dengan asam. Senyawa golongan triterpenoid ditandai dengan timbulnya warna merah sedangkan

senyawa golongan steroid ditandai oleh terbentuknya warna hijau (Septyaningsih, 2010). Reaksi terpenoid atau steroid dapat dilihat pada Gambar 11.

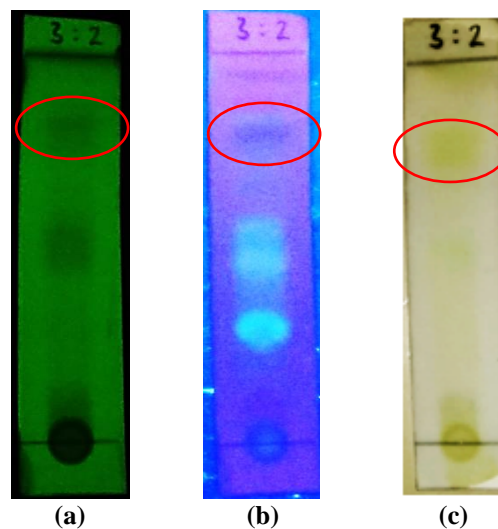
4.4 Identifikasi Flavonoid Menggunakan KLT

Identifikasi flavonoid ekstrak etanol daun kirinyuh dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Metode KLT dipilih karena penggunaannya mudah, kecepatan pemisahan, dapat menganalisis secara kualitatif dan kuantitatif dari satu atau lebih komponen yang terdapat dalam sampel, eluen yang digunakan sedikit, dan tingkat kepolaran eluen dapat diubah serta diatur dalam beberapa menit (Sari, 2011). Identifikasi flavonoid dilakukan pada plat silika GF₂₅₄ berukuran 1 x 5 cm yang telah dikeringkan terlebih dahulu dalam oven untuk mengaktifkan plat dan mengefisienkan proses elusi.

Ekstrak yang telah dilarutkan dengan etanol ditotolkan pada plat menggunakan pipet kapiler, kemudian dielusi dengan menggunakan eluen n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan 3:2. Plat KLT kemudian diamati bercak dibawah lampu UV 254 nm. Plat akan berfluoresensi sehingga senyawa akan tampak sebagai noda gelap akibat adanya ikatan rangkap terkonjugasi yang berinteraksi dengan sinar UV 254 nm. Pengujian dibawah sinar UV 366 nm akan terjadi interaksi dengan gugus kromofor pada senyawa sehingga berfluoresensi dan plat akan menjadi gelap. Kandungan flavonoid yang terdapat dalam larutan ekstrak akan berfluoresensi kuning, biru atau hijau pada UV 366 nm.

Hasil identifikasi flavonoid dipastikan dengan cara plat disemprot dengan reagen penampak bercak alumunium klorida (AlCl₃). Penampak bercak AlCl₃ dipilih karena dapat bereaksi dengan flavonoid membentuk ikatan kompleks dengan gugus keto pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5

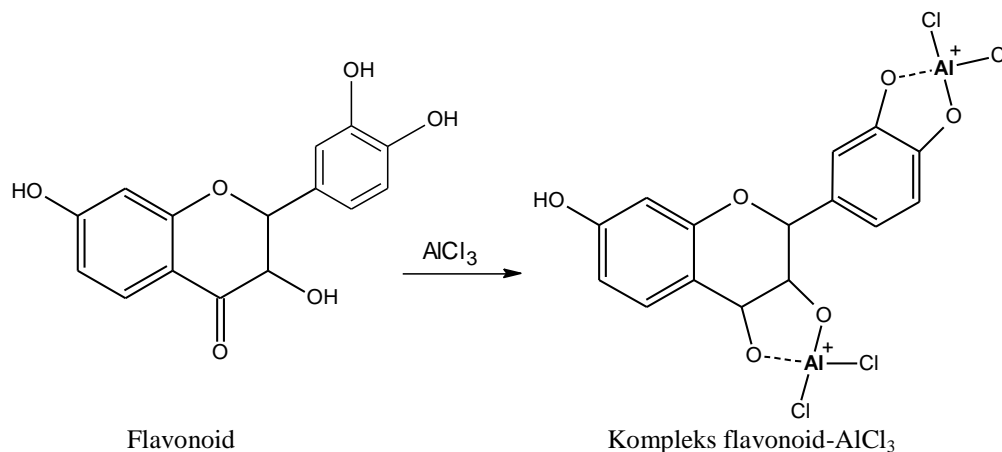
(Markham, 1988). Adanya perubahan warna menjadi kuning maka positif mengandung flavonoid. Reaksi AlCl_3 dengan flavonoid dapat dilihat pada Gambar 13.



Keterangan:
 Fase diam = silika gel GF254
 Fase gerak = n-heksana:etil asetat (3:2)

Gambar 12. Hasil KLT Flavonoid ekstrak etanol daun kirinyuh (a) UV 254 nm (b) UV 366 nm (c) setelah disemprot AlCl_3

Pereaksi semprot yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid berupa aluminium klorida (AlCl_3). Menurut Harborne (1987), keberadaan senyawa flavonoid ditandai dengan bercak yang berwarna kuning sampai coklat pada sinar tampak dan fluoresensi biru pada sinar UV 366 nm. Berdasarkan hasil kromatogram ekstrak dengan pereaksi semprot aluminium klorida menunjukkan warna kuning. Senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun mindi akan berikatan dengan aluminium (Al) sehingga membentuk kompleks stabil yang berwarna kuning (Gambar 12) (Harborne, 1987). Berdasarkan uji, diketahui bahwa ekstrak etanol daun mindi positif mengandung senyawa flavonoid.



Gambar 13. Reaksi pembentukan kompleks flavonoid dengan AlCl₃

4.5 Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Penentuan panjang gelombang maksimum digunakan untuk mengetahui pada serapan berapa zat yang dibaca oleh spektrofotometer UV secara optimum. Tujuan penentuan panjang gelombang maksimum agar mengetahui daerah serapan yang dapat dihasilkan yang berupa nilai absorbansi dari larutan baku kuersetin yang diukur serapannya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 400 – 500 nm (Irvan *et al.*, 2016).

Pada pengukuran panjang gelombang larutan sampel ditambahkan AlCl₃ yang dapat membentuk kompleks sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak) dan penambahan natrium asetat yang bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (tampak) (Chang *et al.*, 2002). Pembentukan senyawa kompleks antara gugus OH pada senyawa flavonoid dengan AlCl₃ dapat dilihat pada Gambar 13. Berdasarkan teori nilai panjang gelombang maksimum kuersetin sebesar 400 – 500 nm (Irvan *et al.*, 2016). Kurva kalibrasi dapat dilihat pada Lampiran 3.

4.6 Pembuatan kurva baku

Kurva kalibrasi menggambarkan hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi yang berupa garis lurus ditunjukkan melalui nilai r (koefisien korelasi). Syarat kurva kalibrasi yang baik adalah nilai $r > 0,99$ yang menunjukkan semakin linearnya hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Kriswanto dkk., 2014). Kurva baku yang dibuat adalah kurva baku kuersetin yang dipilih sebagai standar dalam penetapan flavonoid total ekstrak dengan seri konsentrasi 10; 20; 30; 40; dan 50 ppm, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 431 nm. Nilai absorbansi dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier. Dari kurva kalibrasi diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,041x + 0,0143$ dengan nilai r sebesar 0,992.

4.7 Penentuan Flavonoid Total

Kuersetin dipilih sebagai standar karena termasuk senyawa flavonol yaitu flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida, dan peroksil) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi, karena dapat menghasilkan radikal fenoksil yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Sri, 2008). Pada penelitian ini kandungan flavonoid total ditentukan berdasarkan metode kalorimetri (Chang *et al.*, 2002), dimana prinsip dari metode kalorimetri ini adalah $AlCl_3$ membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu $AlCl_3$ juga membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus orto dihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Katja *et al.*, 2009). Berdasarkan persamaan regresi yang didapatkan dari kurva baku, jumlah

flavonoid total ekstrak etanol daun kirinyuh sebesar 16,8069 mg/g ekstrak (Lampiran 4).

4.8 Pemberian Sediaan dan Penginduksian Hewan Uji

Tikus putih jantan galur Wistar 25 ekor yang digunakan memiliki kriteria usia 2 – 3 bulan dan bobot ± 200 g. Hewan uji yang digunakan berada dalam keadaan yang sehat ditandai dengan gerak yang aktif, bulu yang tidak berdiri, dan mata yang jernih. Penggunaan tikus dalam penelitian ini memiliki umur ± 2 bulan dikarenakan memiliki nafsu makan yang kuat dan masih dalam tahap pertumbuhan yang optimal (Wilkinson *et al.*, 2000). Pemilihan tikus putih jantan sebagai hewan uji karena memiliki stabilitas hormonal yang lebih baik dibandingkan dengan tikus putih betina, tikus putih betina mengalami masa esterus, bunting, serta hormon estrogen yang mampu mempengaruhi hasil pengamatan. Hormon estrogen pada tikus betina dapat mempengaruhi hasil pengamatan, karena hormon estrogen dapat menaikkan kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) dan menurunkan kadar LDL (*Low Density Lipoprotein*) dengan cara mencegah proses oksidasi LDL (Pratiwi, 2010). Tikus galur Wistar dipilih karena mempunyai kemampuan metabolisme obat yang relatif lebih cepat sehingga lebih sensitif bila digunakan dalam penelitian (Yuriska, 2009).

Tikus dikelompokkan ke dalam 5 kelompok, seluruh kelompok tikus diberikan induksi diet tinggi lemak untuk meningkatkan kadar kolesterol total dan LDL dalam darah. Kontrol positif diberikan simvastatin sebagai pembanding karena merupakan hipolipidemik yang paling aman dan efektif terutama untuk menurunkan kolesterol dengan menghambat HMG KoA (*Hidroksi metilglutaril-*

koenzim A) reduktase sehingga dapat menghambat sintesis kolesterol di hati (Suyatna, 2007).

Proses aklimatisasi dilakukan selama satu minggu pada hewan uji bertujuan untuk mengadaptasikan tikus pada kondisi laboratorium sehingga tidak muncul stres pada tikus. Selama masa aklimatisasi hewan uji diberikan pakan standar dan air minum secukupnya. Hewan uji selanjutnya diberikan induksi suplemen tinggi lemak secara per oral selama 15 hari untuk meningkatkan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus. Kenaikan kadar kolesterol total setelah pemberian suplemen tinggi lemak disebabkan karena komposisi suplemen tinggi lemak yang digunakan. Komposisi dari suplemen tinggi lemak diantaranya minyak babi, lemak babi, mentega, dan kuning telur bebek yang merupakan sumber kolesterol dan lemak sehingga dapat meningkatkan kadar kolesterol total. Menurut Dumadi (2002) lemak babi mengandung kolesterol sebesar 130mg/10g bahan, kuning telur 263mg/10g sedangkan mentega mengandung kolesterol sebesar 25mg/10g bahan. Kuning telur merupakan sumber utama kolesterol dari telur dengan kandungan kolesterol sekitar 250 mg/telur. Konsumsi kuning telur dalam jumlah berlebihan dapat menimbulkan keadaan hiperkolesterolemia (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Minyak babi mengandung asam lemak jenuh yang tinggi seperti asam stearat dan asam palmitat. Lemak jenuh mengakibatkan kadar trigliserida dalam darah meningkat dan merupakan prekursor kolesterol (Baraas, 1993). Mengonsumsi lemak berlebihan mengakibatkan hiperlipidemia dengan meningkatnya ApoB kolesterol dan kadar LDL. Meningkatnya ApoB (Apolipoprotein-B) kolesterol dihubungkan dengan berkurangnya fungsi reseptor

LDL (Verd *et al.*, 1999). Setelah hewan uji dinyatakan hiperlipidemia, hewan uji selanjutnya diberikan perlakuan sesuai dengan kelompok masing-masing. Pemberian perlakuan dilakukan selama 14 hari untuk melihat adanya pengaruh perlakuan terhadap kadar kolesterol total dan LDL tikus.

Selain penginduksian dengan suplemen tinggi lemak, hewan uji juga diberikan propiltiourasil (PTU) secara per oral. Propiltiourasil merupakan derivat pirimidin (analog dari metiltiourasil), berkhasiat sebagai tiroid statik. Propiltiourasil bekerja sebagai antitiroid yang menghambat sel-sel tiroid pada tikus sehingga produksi hormon tiroid terhambat dan mengakibatkan hipotiroidisme. Pengaruh langsung hipotiroidisme pada metabolisme lipoprotein adalah peningkatan kadar kolesterol, terutama LDL yang diakibatkan oleh penekanan metabolik pada reseptor LDL, sehingga kadar LDL akan meningkat (Rahayuningsih dan Tita, 2015).

Ekstrak etanol daun kirinyuh diberikan secara oral dalam bentuk sediaan suspensi. Ekstrak tidak larut sempurna didalam *aquadest* sehingga dipilih NaCMC 0,5% untuk mendispersikan ekstrak ke dalam air. Surfaktan nonionik berupa NaCMC dipilih karena tidak terionisasi di dalam larutan dan tidak bereaksi secara kimia dengan bahan lain. NaCMC dapat meningkatkan stabilitas fisika sediaan suspensi melalui pembentukan miselar (Rowe *et al.*, 2009).

4.9 Pengamatan Berat Badan Tikus

Penimbangan berat badan tikus dilakukan setiap hari selama pemberian suplemen tinggi lemak dan saat diberi perlakuan berdasarkan kelompok. Peningkatan berat badan setelah mengkonsumsi pakan diet tinggi lemak dapat disebabkan karena bertambahnya jumlah lemak yang terdeposit pada jaringan

adiposa terutama ada pada rongga perut (Herwiyarisanta, 2010). Lemak yang terdeposit dapat memicu terbentuknya trigliserida berlebih. Menurut Agus (2004), kelebihan trigliserida dalam darah dan jaringan adiposa dapat menyebabkan banyaknya jumlah sel lemak dalam tubuh dan semakin bertambah besar ukuran sel yang ada sehingga berat badan mengalami kenaikan. Terjadi kenaikan berat badan saat penginduksian suplemen tinggi lemak dan PTU karena adanya kandungan lemak yang terlalu banyak, dan dilakukan selama 15 hari yang menyebabkan terjadinya penumpukan yang berlebih. Penimbangan berat badan dilakukan untuk melihat konsistensi kenaikan berat badan, hasil penimbangan berat badan tikus dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Rata-rata berat badan tikus

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata berat badan tikus (g) ± SD	
	Setelah Induksi Tinggi Lemak	Setelah Perlakuan*
Kontrol Negatif (Na CMC)	217,80 ± 5,55	213,57 ± 1,59
Kontrol Positif (PTU)	214,81 ± 12,66	194,78 ± 19,89
Kelompok I (Ekstrak 100 mg)	205,35 ± 14,27	190,79 ± 8,53
Kelompok II (Ekstrak 200 mg)	254,28 ± 13,08	235,50 ± 9,67
Kelompok III (Ekstrak 400 mg)	249,32 ± 16,16	233,96 ± 8,99

Ket: (*) : p<0,05 data berbeda signifikan terhadap nilai setelah induksi

Hasil data tabel 5 menunjukkan bahwa berat badan semua hewan uji mengalami peningkatan setelah pemberian induksi suplemen tinggi lemak selama 14 hari. Hal ini disebabkan karena komposisi dari suplemen tinggi lemak. Minyak babi mengandung asam lemak jenuh yang tinggi. Lemak jenuh mengakibatkan kadar trigliserida dalam darah meningkat dan merupakan prekursor kolesterol, sehingga minyak babi dapat meningkatkan berat badan tikus (Baraas, 1993). Lemak yang berlebih akan dimetabolisme menjadi trigliserida dalam tubuh dan disimpan di dalam jaringan adiposa mengakibatkan peningkatan berat badan (Tsalissavrina dkk., 2006).

Tubuh dalam keadaan normal dapat mempertahankan keseimbangan kolesterol melalui mekanisme penghambatan umpan balik dengan cara kolesterol sel menghambat biosintesis kolesterol baru. Apabila kadar kolesterol darah meningkat, kolesterol akan menghambat biosintesisnya dengan cara menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase (Hidroksi Metil Glutaril KoA reduktase) yaitu enzim yang mengontrol tahap pembatas kecepatan pada pembentukan kolesterol (Murray, 2002). Diet tinggi lemak berlebih mengakibatkan enzim HMG-KoA reduktase ini tidak dapat menjalankan fungsinya secara maksimal, dengan demikian kelebihan lemak akan disimpan dalam jaringan adiposa yang berperan dalam peningkatan berat badan tikus (Ahmed dan Olfat, 2010).

Setelah 14 hari, pemberian induksi suplemen tinggi lemak dihentikan, hewan uji diberikan pakan standar dan diberikan perlakuan sesuai kelompok uji. Semua hewan uji mengalami penurunan berat badan, meskipun pada kontrol negatif mengalami penurunan berat badan yang paling rendah jika dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kelompok dosis ekstrak. Hal ini disebabkan karena pada kontrol negatif, hewan uji tidak diberikan perlakuan apapun sehingga tidak mengalami penurunan badan yang terlalu besar. Kelompok kontrol positif mengalami penurunan berat badan yang cukup besar. Hal ini dikarenakan pemberian simvastatin pada kontrol positif yang merupakan inhibitor enzim HMG-KoA reduktase yang dapat mengganggu sintesis kolesterol dalam hepar. Akibat gangguan dari biosintesis kolesterol, maka pembentukan VLDL di hepar pun terhambat sehingga kadar trigliserida darah jadi menurun karena penurunan produksi VLDL yang berfungsi sebagai pengangkut trigliserida dalam pembuluh darah. Kadar trigliserida yang menurun menyebabkan penyimpanan dalam

jaringan adiposa juga turun (Kasim *et al.*, 1992). Hal inilah yang menyebabkan terjadinya penurunan berat badan pada tikus.

Hewan uji pada kelompok dosis ekstrak etanol daun kirinyuh juga mengalami penurunan berat badan, sehingga ada kemungkinan ekstrak etanol daun kirinyuh dapat menurunkan berat badan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena kandungan senyawa-senyawa yang ada dalam ekstrak diantaranya senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid dapat menurunkan berat badan tikus sebesar 7,85% (Ranti dkk., 2013). Flavonoid dapat menghambat FAS (*Fatty Acid Synthase*) dengan cara menghalangi Asetil-Koa dan Malonil-Koa yang merupakan substrat dari asil-transferase yang berpotensi menghambat gen-gen yang berperan dalam adipogenesis sehingga menurunkan jumlah adiposit (Jeyakumar *et al.*, 2005). Hasil uji t-berpasangan diperoleh bahwa terdapat perbedaan signifikan antara berat badan hewan uji setelah induksi suplemen tinggi lemak dan setelah perlakuan ($p < 0,05$) (Lampiran 19).

4.10 Pengukuran Kolesterol Total dan LDL

Pengukuran kadar kolesterol total dan LDL pada penelitian ini dilakukan 2 kali yaitu setelah induksi suplemen tinggi lemak, dan setelah pemberian bahan uji. Darah diambil pada bagian *plexus retroorbitalis* mata tikus karena pengambilan darah relatif cepat dan lancar sehingga dapat meminimalisir terjadinya hemolisis (Nurchayaningtyas, 2012). Pengukuran kolesterol total dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri enzimatis karena metode ini menghasilkan kadar yang akurat dan spesifik untuk mengukur kadar kolesterol total melalui reaksi enzimatis dan menghasilkan senyawa yang berwarna yang dapat diukur serapannya secara spektrofotometri (Winder, 1997). Pengukuran kadar LDL dapat

dilakukan dengan metode *direct* (*presipitat*). Metode *direct* dapat langsung mengukur kadar LDL tanpa perlu mengukur kadar kolesterol, trigliserida dan HDL (Sun *et al.*, 2005). Hasil pengukuran kadar kolesterol total hewan uji dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pengukuran kadar kolesterol total hewan uji

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Kadar Kolesterol Total (mg/dL)± SD		
	Setelah Induksi Tinggi Lemak	Setelah Perlakuan *	Rata-Rata Penurunan
Kontrol Negatif	97,55 ± 2,62	96,54 ± 2,42	1,01 ± 0,34
Kontrol Positif	170,10 ± 12,59	111,28 ± 10,46	58,98 ± 2,81
Kelompok I	83,87 ± 7,54	74,77 ± 8,48	9,1 ± 5,84
Kelompok II	104,98 ± 2,60	85,38 ± 12,32	19,6 ± 12,86
Kelompok III	125,85 ± 22,23	103,81 ± 9,14	22,04 ± 14,32

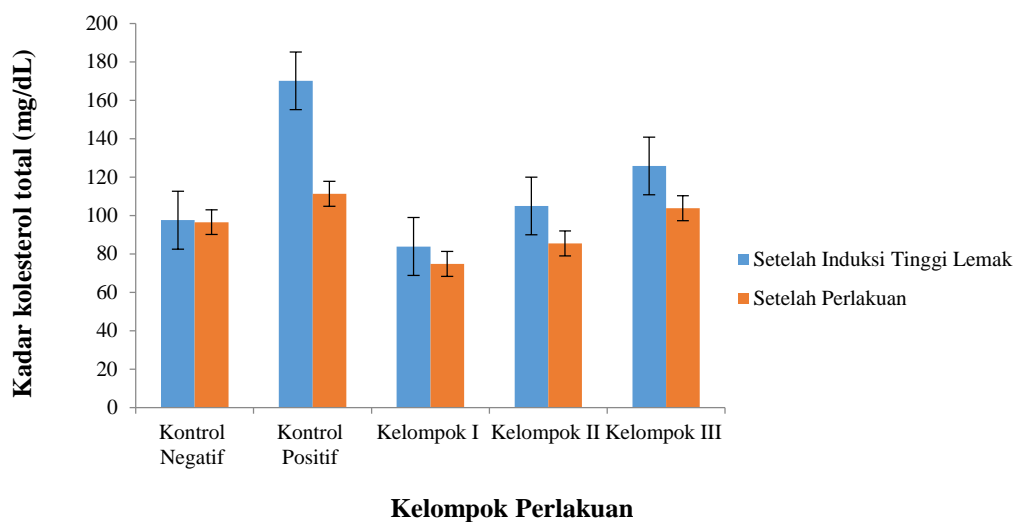
Ket: (*): $p < 0,05$ data berbeda signifikan terhadap nilai setelah induksi

Batasan normal untuk kolesterol total pada tikus adalah 10 – 54 mg/dL (Harini, 2009). Tabel 6 menunjukkan kadar kolesterol total setiap kelompok setelah diinduksi pakan tinggi lemak dan setelah diberi perlakuan. Perbedaan kadar kolesterol dan LDL tiap hewan uji berbeda karena dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti kondisi biologi dan faktor metabolisme dalam tubuh tikus yang berbeda-beda (Widyaningsih, 2011).

Penginduksian suplemen tinggi lemak dan PTU selama 14 hari mampu meningkatkan kadar kolesterol total pada semua kelompok hewan uji. Kadar kolesterol total setelah induksi suplemen tinggi lemak dan PTU dapat meningkatkan kadar kolesterol total melebihi batas normal. Hal ini sejalan dengan pernyataan Grundy (1991) bahwa konsumsi makanan yang kaya asam lemak dan kolesterol dapat menghambat pembentukan reseptor LDL, sehingga kolesterol terakumulasi di dalam darah. Sedangkan peran PTU yaitu sebagai zat antitiroid yang dapat merusak kelenjar tiroid dan menyebabkan kondisi hipotiroid. Kondisi tersebut menyebabkan terjadinya penurunan sintesis dan ekspresi reseptor

LDL di jaringan. Oleh karena itu, LDL banyak beredar di dalam darah dan menjadi penyebab hiperlipidemia (Santillo, 1999). Hasil uji statistika dengan t-berpasangan menunjukkan adanya perbedaan bermakna kadar kolesterol total hewan uji sebelum dan setelah induksi suplemen tinggi lemak dan PTU ($p < 0,05$) (Lampiran 16e).

Perlakuan hewan uji dilakukan selama 14 hari dengan pemberian pakan standar dan perlakuan uji sesuai dengan Tabel 3. Setelah diberikan perlakuan, terjadi penurunan kadar kolesterol total pada kelompok kontrol positif, kelompok I, kelompok II dan kelompok III. Kelompok kontrol negatif hanya terjadi penurunan yang sangat sedikit, hal ini disebabkan karena pada kontrol negatif hewan uji tidak mendapatkan perlakuan uji apapun. Penurunan kadar kolesterol total dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Grafik penurunan kadar kolesterol total (mg/dL)

Hasil penelitian menunjukkan penurunan kolesterol total yang paling besar terjadi pada kelompok kontrol positif yaitu sebesar $58,98 \pm 2,81$ mg/dL. Kelompok kontrol positif mengalami penurunan kadar kolesterol total karena

adanya pemberian simvastatin yang memiliki struktur yang mirip dengan HMG-KoA reduktase, bekerja dengan cara menghambat HMG-KoA reduktase secara kompetitif pada proses sintesis kolesterol di hati (Suyatna, 2007). Berdasarkan mekanisme tersebut maka dengan pemberian simvastatin pada kelompok kontrol positif mampu menurunkan kadar kolesterol, sedangkan kelompok kontrol negatif hanya mengalami sedikit penurunan yaitu sebesar $1,01 \pm 0,34$ mg/dL. Hal ini dikarenakan hewan uji pada kontrol negatif hanya diberikan larutan NaCMC yang berfungsi sebagai agen pensuspensi dan tidak diberikan apapun yang dapat berpotensi menurunkan kadar kolesterol total sehingga kadar kolesterol hewan uji hanya mengalami sedikit penurunan. Terjadinya penurunan kadar kolesterol total pada kontrol negatif salah satunya dapat disebabkan oleh adanya diet kolesterol, asam lemak, dan kalori. Secara alami, tubuh dapat mendegradasi kelebihan kolesterol menjadi asam empedu (Murray dkk.,2006).

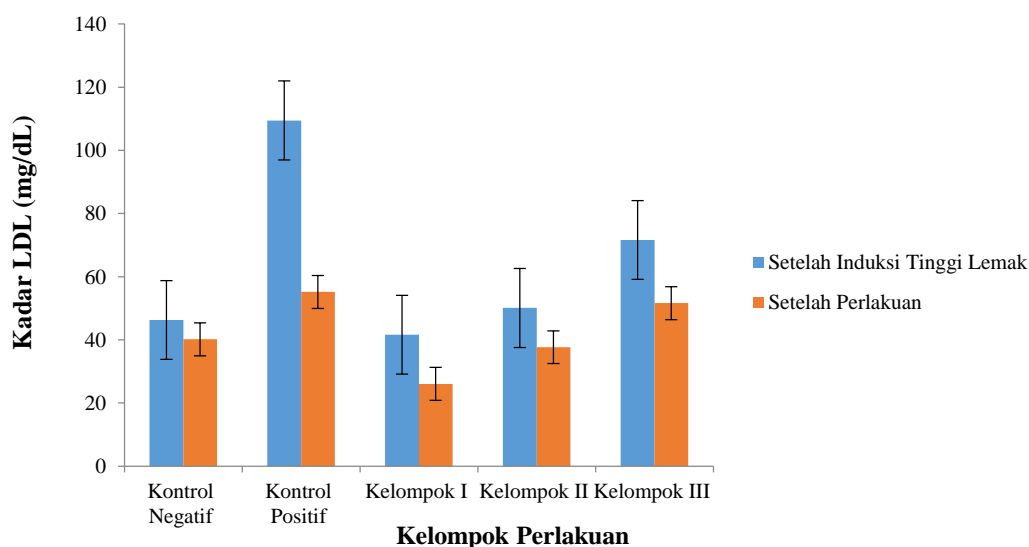
Pengukuran kadar kolesterol total pada kelompok I, II, dan III memberikan rata-rata penurunan sebesar $9,1 \pm 5,84$; $19,6 \pm 12,86$; dan $22,04 \pm 14,32$ mg/dL. Dosis ekstrak daun kirinyuh yang paling baik dalam menurunkan kadar kolesterol yaitu pada perlakuan kelompok III (400 mg/200 gBB). Hal ini disebabkan karena adanya senyawa metabolit yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun kirinyuh. Hasil uji statistik dengan t-berpasangan menunjukkan adanya perbedaan bermakna kadar kolesterol total hewan uji sebelum dan setelah perlakuan ($p < 0,05$) (Lampiran 16e). Selain mengamati parameter kadar kolesterol total, pada penelitian ini juga diamati kadar LDL pada hewan uji. Hasil pengukuran kadar LDL hewan uji dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil pengukuran kadar LDL hewan uji

Kelompok Perlakuan	Rata-Rata Kadar LDL (mg/dL) ± SD		
	Setelah Induksi Tinggi Lemak	Setelah Perlakuan*	Rata-Rata Penurunan
Kontrol Negatif	46,29 ± 7,02	40,18 ± 3,55	6,12 ± 3,65
Kontrol Positif	109,44 ± 11,88	55,16 ± 13,05	54,28 ± 7,10
Kelompok I	41,63 ± 7,86	26,06 ± 4,48	10,51 ± 5,16
Kelompok II	50,12 ± 4,84	37,68 ± 8,41	12,48 ± 4,96
Kelompok III	71,62 ± 21,28	51,61 ± 11,98	20,05 ± 9,84

Ket: (*): $p < 0,05$ data berbeda signifikan terhadap nilai setelah induksi

Batasan normal untuk kadar LDL adalah 7 – 27,2mg/dL (Herwiyarirasanta, 2010). Tabel 7 menunjukkan kadar LDL tikus yang mengalami peningkatan setelah penginduksian suplemen tinggi lemak. Hasil uji statistik dengan t-berpasangan menunjukkan adanya perbedaan bermakna kadar LDL hewan uji sebelum dan setelah induksi suplemen tinggi lemak dan PTU ($p < 0,05$) (Lampiran 17e). Kadar LDL setelah perlakuan mengalami penurunan pada semua kelompok. Penurunan kadar LDL dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Grafik penurunan kadar LDL (mg/dL)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kelompok kontrol positif memiliki rata-rata penurunan yang paling besar dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini disebabkan karena pada kelompok kontrol positif diberikan simvastatin

yang dapat menghambat enzim HMG-KoA reduktase secara kompetitif pada proses sintesis kolesterol di hati (Witztum, 1996). HMG-KoA reduktase merupakan enzim yang bertanggung jawab mengkonversi HMG-KoA menjadi asam mevalonat yang merupakan tahap awal dalam jalur biosintesis kolesterol (Staf Pengajar FK Unsri, 2004). Kelompok kontrol negatif mengalami penurunan kadar LDL yang sangat sedikit, hal ini dikarenakan pada kontrol negatif hewan uji tidak diberikan apapun yang dapat menurunkan kadar LDL hewan uji. Kelompok III memiliki rata-rata penurunan kadar LDL yang lebih besar dibandingkan dengan kelompok I dan II namun lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif, yaitu sebesar $20,05 \pm 9,84$ mg/dL. Hasil uji statistika dengan t-berpasangan menunjukkan adanya perbedaan bermakna kadar LDL hewan uji sebelum dan setelah perlakuan ($p < 0,05$) (Lampiran 17e).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kirinyuh dapat menurunkan kadar kolesterol total dan LDL hewan uji. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kirinyuh mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, fenolik, saponin dan steroid. Kemungkinan efek penurunan tersebut disebabkan oleh senyawa golongan tersebut. (Mogghadamtousi, 2013).

Flavonoid bekerja dengan menurunkan sekresi apolipoprotein B (apo B) dalam hepatosit dan juga menurunkan aktivitas dari enzim HMG KoA reduktase, serta menghambat aktivitas enzim 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA yang menyebabkan penghambatan sintesis kolesterol (Arief dkk., 2012). Flavonoid dapat mempengaruhi proses metabolisme kolesterol LDL dengan meningkatkan kemampuan LDL untuk terikat pada reseptornya. LDL yang terikat pada reseptor

akan termetabolisme menjadi kolesterol ester di jaringan. HDL akan mengikat kolesterol ester yang terdapat pada jaringan dan kemudian dieksresi ke usus halus (Wilcox *et al.*, 2001). Senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan berperan dalam menunda proses oksidasi lipid sehingga dapat mencegah kenaikan kadar LDL dan kolesterol total (Davies, 2003).

Selain flavonoid, senyawa tanin kemungkinan berperan dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus. Mekanisme senyawa tanin dalam ekstrak etanol daun kirinyuh terhadap penurunan kadar LDL adalah dengan menghambat kerja dari enzim HMG-KoA reduktase, yaitu enzim yang berperan dalam pembentukan kolesterol. Arief dkk. (2012) melaporkan bahwa tanin di dalam tubuh akan berikatan dengan protein tubuh dan akan melapisi dinding usus, sehingga penyerapan lemak di dalam usus akan terhambat.

Saponin yang terdapat pada ekstrak etanol daun kirinyuh juga kemungkinan berpengaruh dalam menurunkan kadar kolesterol dan LDL pada tikus. Penelitian Francis *et al* (2002) menyatakan bahwa saponin dapat menurunkan kadar serum kolesterol dengan kemungkinan adanya pengikatan saponin dengan kolesterol. Sementara menurut penelitian lain Saponin dapat menurunkan penyerapan kolesterol, dan meningkatkan ekskresi fekal dari asam empedu yang merupakan produk sekresi kolesterol (Harborne, 1987).

Steroid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun kirinyuh kemungkinan berperan dalam penurunan kadar kolesterol dan LDL dengan cara menghambat ikatan *sterol regulatory elementbinding protein* (SREBP) dengan *sterol regulatory element* (SRE), protein yang berperan dalam transkripsi gen reseptor LDL. Hambatan ini mengakibatkan penurunan aktivitas enzim 3-hidroksi-3-

metilglutaril KoAreduktase (HMG-KoAreduktase) sehingga sintesis kolesterol dalam sel berkurang. Selain itu sekresi VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*) oleh sel-sel hati akan menurun sehingga menyebabkan konversi VLDL ke LDL berkurang. Hal ini berdampak pada penurunan kadar LDL dalam tubuh (Trautwein *et al.*, 2006). Menurut Agustina (2009), senyawa alkaloid dapat menghambat aktivitas enzim lipase sehingga dapat menghambat pemecahan lemak sehingga berkurangnya jumlah lemak yang diabsorpsi.

Analisis data dilakukan menggunakan aplikasi SPSS[®], diketahui bahwa uji normalitas data kadar kolesterol total dan LDL terdistribusi normal dengan nilai signifikansi $>0,05$ (Lampiran 16a dan 17a). Uji homogenitas kadar kolesterol total dan LDL didapatkan nilai signifikan $p>0,05$ yang menyatakan bahwa data memiliki varians yang sama (homogen). Uji kadar kolesterol total dan LDL menggunakan *one way* ANOVA didapatkan nilai signifikansi $p< 0,05$ yang menyatakan bahwa data memiliki hubungan dan signifikan. *One way* ANOVA dilakukan untuk mengamati perbedaan data dalam satu kelompok uji, sehingga berdasarkan data tersebut, terdapat perbedaan penurunan kadar kolesterol dan LDL yang signifikan antar kelompok. Hasil uji *one way* ANOVA dapat dilihat pada Lampiran 16b dan 17b.

Uji statistika *post hoc* (Lampiran 16c dan 17c) bertujuan untuk menunjukkan adanya perbedaan signifikan kadar kolesterol total antar kelompok. Hasil analisis uji *post hoc*, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan data penurunan kadar kolesterol dan LDL antara kelompok kontrol positif dengan kelompok I, II, dan III ($p>0,05$). Kelompok kontrol positif dan kelompok I, II, dan III menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan kelompok kontrol

negatif ($p < 0,05$). Uji t-berpasangan dilakukan pada data kadar kolesterol total dan LDL sebelum dan setelah hewan uji diinduksi suplemen tinggi lemak (Lampiran 16d dan 17d) dan pada data kadar kolesterol total dan LDL antar kelompok sesudah diberikan sediaan uji (Lampiran 16e dan 17e). Hasil uji t-berpasangan dari kedua data tersebut menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$).

Berdasarkan hasil uji statistika, dapat disimpulkan bahwa efek penurunan kadar kolesterol total dan LDL kelompok kontrol positif lebih baik dibandingkan dengan kelompok I, II, dan III, tetapi tidak terdapat perbedaan yang signifikan antar data tersebut. Ketiga variasi dosis ekstrak etanol daun kirinyuh terbukti memiliki potensi terhadap penurunan kadar kolesterol total dan LDL pada tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi PTU dan suplemen tinggi lemak.

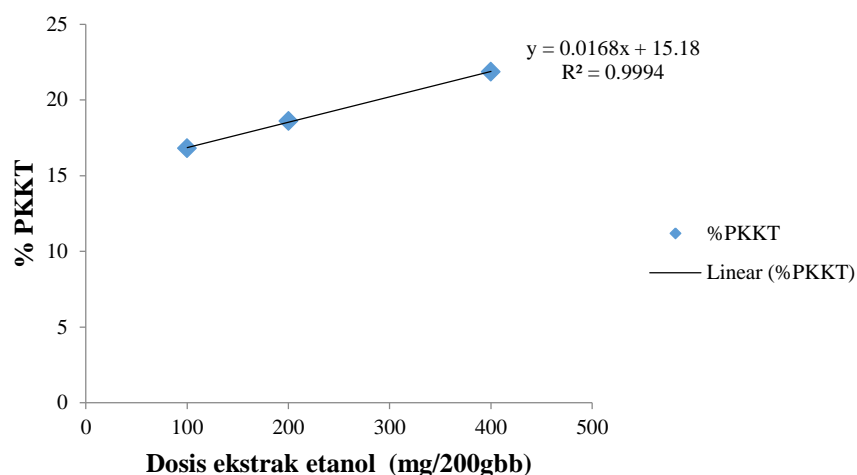
4.11 *Effective Dose 50 (ED₅₀)*

Menurut Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI (2011), dosis efektif 50% (ED₅₀) adalah dosis yang menimbulkan efek terapi pada 50% individu (dosis terapi median). ED₅₀ penurunan kadar kolesterol total dihitung dengan regresi linier antara dosis dengan persen penurunan kadar kolesterol total (%PKKT). ED₅₀ penurunan kadar LDL dihitung dengan regresi linier antara dosis dengan persen penurunan kadar LDL (%PKLDL).

Tabel 8. Dosis ekstrak etanol daun kirinyuh dan %PKKT

Dosis	%PKKT
100 mg/200 gBB	16,81%
200 mg/200 gBB	18,60%
400 mg/200 gBB	21,86%

Keterangan: x (dosis) dan y (%PKKT)



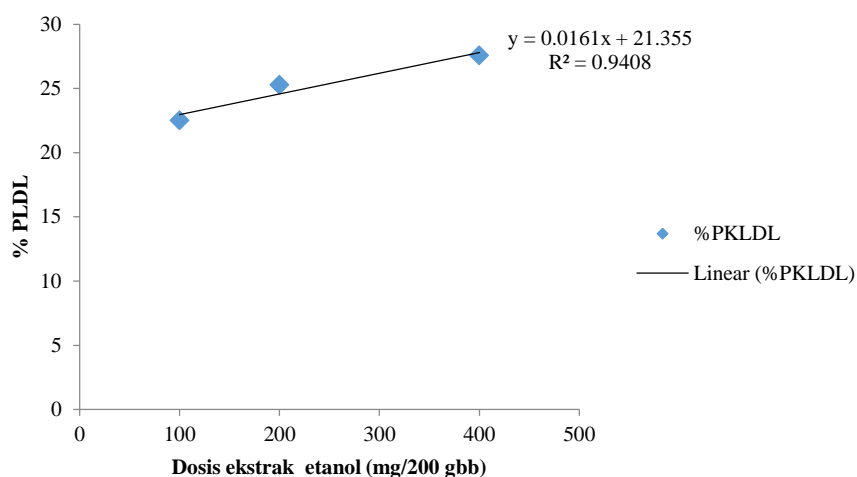
Gambar 16. Grafik regresi linier antara dosis (mg/200 gBB) dan %PKKT ekstrak etanol daun kirinyuh

Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 0,016x + 15,18$ dengan nilai $R^2 = 0,999$ (Lampiran 20). Nilai ED_{50} dari ekstrak etanol daun kirinyuh dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi, y adalah persen dosis efektif (50%) dan x adalah dosis dari ekstrak etanol yang dapat menurunkan kadar kolesterol darah tikus sebesar 50%. Hasil perhitungan ED_{50} menunjukkan bahwa ED_{50} dari ekstrak etanol daun kirinyuh sebesar 2176 mg/200 gBB (Lampiran 20).

Tabel 9. Dosis ekstrak etanol daun kirinyuh dan %PKLDL

Dosis	%PKLDL
100 mg/200 gBB	22,50%
200 mg/200 gBB	25,28%
400 mg/200 gBB	27,57%

Keterangan: x (dosis) dan y (%PKLDL)



Gambar 17. Grafik regresi linier antara dosis (mg/200 gBB) dan %PKLDL ekstrak etanol daun kirinyuh

Persamaan regresi linier yang diperoleh adalah $y = 0,016x + 21,35$ dengan nilai $R^2 = 0,940$ (Lampiran 21). Nilai ED_{50} dari ekstrak etanol daun kirinyuh dapat dihitung dengan menggunakan persamaan regresi, y adalah persen dosis efektif (50%) dan x adalah dosis dari ekstrak etanol daun kirinyuh yang dapat menurunkan kadar LDL tikus sebesar 50%. Hasil perhitungan ED_{50} menunjukkan bahwa ED_{50} dari ekstrak etanol daun kirinyuh sebesar 3123 mg/200 gBB (Lampiran 21).

Dosis efektif (ED_{50}) pada ekstrak lebih besar jika dibandingkan dengan dosis simvastatin 0,193 mg/200 gBB, sehingga dapat dikatakan jika pemberian simvastatin lebih poten dalam menurunkan kadar kolesterol total dan LDL karena hanya membutuhkan dosis yang kecil sedangkan pada ekstrak memerlukan dosis yang besar agar dapat mencapai ED_{50} . Hal ini dikarenakan pada penelitian ini digunakan ekstrak kasar dari daun kirinyuh sehingga masih banyak kandungan senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak tersebut, namun ekstrak etanol daun kirinyuh ini dapat dijadikan alternatif sebagai antihiperlipidemia.

