

BIDANG ILMU : KESEHATAN

**LAPORAN AKHIR
HIBAH BERSAING**



**EKSTRAK TERSTANDAR KAYU KUNING (*Arcangelisia flava*
Merr) SEBAGAI OBAT ANTIHIPERLIPIDEMIA DAN ANTI
ATEROSKLEROSIS : Uji aktivitas Antihiperlipidemia dan
Antiaterosklerosis pada Tikus Diabetes Mellitus Type 2 Resisten Insulin**

Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun

Evi Umayah Ulfa, S.Si.,M.Si.,Apt (NIDN 0028077804/ Ketua)
Ema Rachmawati, S.Farm, M.Sc.,Apt (NIDN 0008038402 /Anggota)

**UNIVERSITAS JEMBER
NOVEMBER 2015**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Ekstrak Terstandar Kayu Kuning (*Arcangelisida flava* Merr) sebagai Obat Antihiperlipidemia dan Antiaterosklerosis : Uji aktivitas Antihiperlipidemia dan Antiaterosklerosis pada Tikus Diabetes Mellitus Type 2 Resisten Insulin

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : EVI Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt.
Perguruan Tinggi : Universitas Jember
NIDN : 0028077804
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Farmasi
Nomor HP : 081803545328
Alamat surel (e-mail) : eviuulfa@gmail.com

Anggota (1)

Nama Lengkap : EMA RACHMAWATI S.Farm.,M.Sc.,Apt
NIDN : 0008038402
Perguruan Tinggi : Universitas Jember
Institusi Mitra (jika ada)
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 70.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 150.000.000,00

Mengetahui,
Dekan Fakultas Farmasi

Jember, 11 - 11 - 2015
Ketua,

(LESTYO WULANDARI, S.Si., Apt., M.Farm) (EVI Umayah Ulfa S.Si., M.Si., Apt.)
NIP/NIK 197604142002122001 NIP/NIK 197807282005012001

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

(Prof. Ir. Achmad Subagio, M.Agr., Ph.D)
NIP/NIK 196905171992011001

RINGKASAN

Diabetes mellitus (DM) merupakan penyakit metabolik yang ditandai peningkatan kadar glukosa darah, yang dapat disebabkan karena resistensi insulin. Kondisi resistensi insulin berhubungan dengan ukuran partikel VLDL yang membesar dan ukuran LDL yang kecil. Selain itu jumlah VLDL dan LDL menjadi semakin meningkat. Hal inilah yang memicu terjadinya komorbid hiperlipidemia pada pasien DM, sehingga menyebabkan pasien DM rentan mengalami penyakit penyumbatan pembuluh jantung.

Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) merupakan tanaman Indonesia yang diduga memiliki aktivitas menurunkan kadar lipid dalam darah, karena adanya kandungan senyawa aktif alkaloid berberin. Berberin diduga memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya kerusakan sel-sel tubuh akibat radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk menguji dan mengembangkan potensi tanaman kayu kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai terapi antihiperlipidemia pada pasien DM untuk mencegah terjadinya resiko pembentukan plak pada pembuluh darah jantung atau aterosklerosis.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji dan mengembangkan potensi tanaman kayu kuning (*Arcangelisia flava*) sebagai terapi antihiperlipidemia pada pasien DM untuk mencegah terjadinya resiko pembentukan plak pada pembuluh darah jantung atau aterosklerosis. Penelitian tahun pertama meliputi standarisasi ekstrak dan uji aktivitas antihiperlipidemia pada hewan uji. Standarisasi ekstrak bertujuan untuk menjamin efektivitas ekstrak kayu kuning sebagai antihiperlipidemia. Hasil penelitian tahun pertama menunjukkan rendemen ekstrak batang kayu kuning menggunakan metode sonikasi sebesar 1,56% b/b. Ekstrak kayu kuning mampu menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL tikus yang hiperlipidemia. Besarnya penurunan kadar kolesterol dan trigliserida dari kelompok dosis 250, 500 mg/kgBB secara berturut turut adalah 7,92% dan 11,41% untuk kolesterol, 8,48 % dan 10,73% untuk trigliserida. Profil LDL tikus mengalami penurunan baik pada dosis 250 maupun 500 mg/KgBB sebesar 20,87% dan 26,01%. Ekstrak a flava dosis 250 mg/KgBB mampu meningkatkan kadar HDL sedangkan pemberian ekstrak A flava dosis 500 mg/KgBB menyebabkan penurunan HDL. Berdasarkan hasil uji histopatologi terhadap aorta tikus dapat disimpulkan bahwa ekstrak *A.flava* memiliki kemampuan memperbaiki gambaran histopatologi aorta melalui penurunan jumlah sel busa dan menurunkan ketebalan tunika. Susut pengeringan, kadar flavonoid dan kadar berberin ekstrak kayu kuning secara berturut turut 1,68%; 7,05 mgQE dan 0,31 %b/b

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan laporan kemajuan penelitian Hibah Bersaing TA 2015 dengan judul **Ekstrak Terstandar Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* Merr) Sebagai Obat Antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis : Uji aktivitas Antihiperlipidemia dan Antiaterosklerosis pada Tikus Diabetes Mellitus Type 2 Resisten Insulin** ini dapat diselesaikan. Laporan akhir penelitian ini disusun dengan maksud sebagai bukti pertanggungjawaban ilmiah atas dana hibah yang telah diterima peneliti. Penelitian ini tidak akan berjalan dengan baik tanpa bantuan dari berbagai pihak. Karenanya, kami mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi sebagai penyandang dana melalui program Hibah Bersaing tahun anggaran 2015. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember, Kepala Laboratorium Biomedik, Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorim Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ijin pelaksanaan penelitian dan penggunaan fasilitas laboratorium dan teknisi laboratrim yang telah banyak membantu pelaksanaan penelitian ini. Akhirnya, kami menyadari bahwa laporan ini masih jauh dari sempurna. Saran dan kritik yang membangun dari rekan-rekan yang bergerak di bidang ilmu yang terkait sangat kami harapkan untuk kesempurnaan penelitian ini.

Jember, 10 November 2015

DAFTAR ISI

SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKTA	iv
DAFTAR ISI	v
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan tentang <i>Arcangelisia flava</i> dan Berberin	5
2.2 Diabetes Melitus	6
2.3 Resiko Penyakit Kardiovaskular pada DM	6
2.4 Uji Toksikologi.....	7
BAB 3. METODE PENELITIAN	7
BAB 4. BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN	15
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN	22
DAFTAR PUSTAKA	23

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Diabetes melitus merupakan penyakit kronik dengan karakteristik hiperglikemi akibat gangguan metabolisme karbohidrat, lipid dan beberapa elemen penting tubuh (Kazi *et al.*, 2008). Penyakit ini banyak di temui di dunia dan menjadi salah satu ancaman bagi kesehatan manusia abad 21. Laporan data epidemiologi Mc.Carty dan Zimmet menunjukkan, bahwa jumlah penderita DM di dunia dari 110,4 juta pada tahun 1994 melonjak 1,5 kali lipat (175,4 juta) pada tahun 2000 dan akan melonjak 2 kali lipat (239,3 juta) pada tahun 2010. Di Indonesia dari jumlah 2,5 juta pada tahun 1994 akan menjadi 5 juta pada tahun 2010 (Tjokroprawiro, 2006). Lima hingga 10 persen merupakan DM tipe 1 (tergantung insulin) dan 90-95% merupakan tipe 2 (tidak tergantung Insulin) (Mc. Guire, 2012)

Kadar gula darah yang tinggi dan berlangsung lama pada penderita diabetes dapat menyebabkan disfungsi atau kegagalan beberapa organ tubuh, terutama pembuluh darah, jantung, mata, ginjal dan saraf (Smelber dan Bare 2008). Diabetes melitus merupakan faktor resiko yang kuat untuk perjalanan penyakit jantung koroner (PJK), penyakit vaskular perifer dan stroke. Delapan puluh persen kematian pada pasien diabetes diakibatkan oleh aterosklerosis. Penyebab aterosklerosis pada penderita DM tipe 2 bersifat multifaktorial yang melibatkan interaksi kompleks berbagai keadaan hiperglikemi, hiperlipidemia, stress oksidatif dan hiperinsulinemia (ADA 2012, Hayat *et al.*, 2004). Hiperglikemi kronik menyebabkan disfungsi endotel melalui berbagai mekanisme antara lain stress oksidatif, peningkatan LDL teroksidasi, penurunan produksi *nitric oxide* (NO), penurunan aktivitas fibrinolitik dan aktivasi koagulasi yang berulang (Mc Guire, 2012; Creager, 2003). Disfungsi endotel akibat stress oksidatif dan resistensi insulin diketahui menjadi penyebab percepatan proses pembentukan lesi aterosklerosis. Kekakuan dan abnormalitas struktur pembuluh darah pada penderita diabetes terjadi akibat peningkatan ekspresi ekspresi *transforming growth factor-beta* (TGF- β). Hiperglikemi dapat memacu aktivitas protein kinase C (CPK) yang selanjutnya meningkatkan ekspresi TGF- β (Creager, 2003).

Tingginya angka kematian pasien DM akibat penyakit aterosklerosis mendorong penemuan berbagai bahan aktif yang dapat mencegah atau mengobati penyakit tersebut. Penanganan aterosklerosis pada penderita DM memerlukan strategi yang komprehensif

meliputi pengontrolan gula darah, pemberian antiplatelet/antikoagulan, maupun penanganan.

Indonesia merupakan negara yang kaya akan keragaman floranya. Masyarakat telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya menanggulangi masalah kesehatan. *Arcangelisia flava* Merr atau yang dikenal kayu kuning merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang biasa digunakan sebagai bahan jamu. Di beberapa daerah Sulawesi, tumbuhan ini umumnya digunakan untuk pengobatan penyakit malaria, kencing manis, kencing batu dalam bentuk rebusan (Wiyanto, 1993; Nagle and Nagle, 2005). Berdasarkan penelitian Perry dan Metzger tahun 1980, batang dan akar kayu kuning telah digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai tonikum, sakit kuning, diare dan sakit kulit (Keawpradub *et al.*, 2005). Tumbuhan yang dilestarikan di Taman Nasional Meru Betiri, Jember ini (Hasanah, 2013), batangnya mengandung senyawa berberin klorida, 8-hidroksiberberin, jatrorrhizin, limasina, palmatin yang semuanya termasuk senyawa alkaloid (Siwon, 1982). Ekstrak metanol *A. flava* diketahui memiliki aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dan sel kanker payudara MCF-7 dibandingkan dengan ekstrak *Coscinium blumeinum* dan *Fibraurea tinctoria*. Fraksi etil asetat *A. flava* terbukti mampu menurunkan kadar gula darah tikus DM resisten insulin. Aktivitas ini diduga disebabkan oleh kandungan berberin di dalamnya (Keawpradub *et al.*, 2005). Berberin mampu menurunkan kadar gula darah melalui mekanisme peningkatan ekspresi reseptor insulin (Zhang *et al.*, 2010). Aktivitas antioksidan berguna untuk menangkal radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL yang selanjutnya menekan aktivasi NK kB. Penghambatan aktivasi NF kB berdampak pada penurunan ekspresi protein inflamasi (TNF- α , ICAM 1) yang memediasi terjadinya aterosklerosis (Ross, 1999).

Adanya senyawa berberin pada *A flava* yang memiliki aktivitas antioksidan dan kemampuan menurunkan kadar gula diharapkan ekstrak *A. flava* mampu menurunkan hiperlipidemia termasuk mencegah pembentukan plak aterosklerosis yang menjadi penyebab kematian utama pada penderita DM.

Penelitian tahun pertama meliputi uji aktivitas antihiperlipidemia, antiaterosklerosis dan standarisasi ekstrak *A.flava*. Uji aktivitas menggunakan tikus DM tipe 2 resisten Insulin yang diinduksi dengan fruktosa 1,8 g/kg BB dan makanan tinggi lemak. Standarisasi bertujuan untuk menjamin kontinuitas efek yang dihasilkan.

Sedangkan uji toksisitas subkronis yang dilakukan pada tahun kedua ditujukan untuk mengetahui keamanan ekstrak tersebut saat digunakan secara klinis. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar penggunaan ekstrak *A. flava* terstandar sebagai agen antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis yang aman dan memiliki keajegan efek. Ekstrak selanjutnya diformulasi menjadi sediaan kapsul untuk meningkatkan aseptabilitasnya.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada tahun pertama adalah:

- a. Apakah ekstrak *A. flava* dapat meningkatkan menurunkan kadar LDL, trigliserida, dan kolesterol total serum tikus putih DM tipe 2 resisten insulin
- b. Apakah pemberian ekstrak *A. flava* mampu meningkatkan kadar HDL serum tikus DM tipe 2 resisten insulin
- c. Apakah pemberian ekstrak *A. flava* mampu memperbaiki plak aterosklerosis yang timbul
- d. Bagaimanakah profil ekstrak terstandar *A. flava*?

Sedangkan rumusan masalah dalam penelitian tahun kedua adalah apakah ekstrak *A. flava* terbukti aman dalam pemakaian sub-kronis dan dapat dibuat sediaan kapsul yang memenuhi persyaratan farmasetika?

1.3 Tujuan Penelitian

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan ekstrak terstandar yang memiliki aktivitas sebagai antihiperlipidemia dan aterosklerosis untuk pasien DM tipe 2 resisten insulin dari batang *A. flava* yang terstandar dan aman. Secara lebih khusus tujuan penelitian dapat dirinci sebagai berikut :

1. Menentukan aktivitas antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis ekstrak *A. flava*
2. Melakukan standarisasi ekstrak *A. flava*
3. Mengetahui tingkat keamanan ekstrak *A. flava* melalui uji toksisitas sub kronis

1.4 Urgensi/Keutamaan penelitian

Penelitian ini perlu dilakukan mengingat prevalensi DM di Indonesia masih cukup tinggi dan 80% diantara penderita DM tersebut meninggal akibat aterosklerosis. Manajemen terapi untuk orang DM dengan komplikasi penyakit jantung koroner memerlukan pendekatan multifaktor. Biaya yang diperlukan untuk perawatan cukup.

Pencarian obat yang efektif untuk menangani antihiperlipidemia masih dilakukan terus. Masyarakat Indonesia biasa memanfaatkan tanaman untuk mengatasi kesehatannya. *A. flava* merupakan tanaman asli Indonesia yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai obat antihiperlipidemia. Tanaman ini banyak ditemukan di kawasan Kawasan Taman Nasional Meru Betiri. Penelitian ini menjadi penting tidak hanya karena adanya aktivitas namun juga dalam upaya untuk mengeksplorasi tanaman rawan yang berpotensi di kawasan TN Meru betiri.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Arcangelisia flava* dan Berberin

Kayu kuning atau *Arcangelisia flava* merupakan tumbuhan merambat dari famili Menispermaceae yang sudah tergolong rawan karena terbatasnya penyebaran (Hasanah, 2013). Batang tumbuhan ini bulat, berdiameter 2-7 cm, panjangnya dapat mencapai 20 m (Heyne, 1987). Bagian dalam batang berwarna kuning dan rasanya pahit. Bentuk daun bundar telur, tebal dan kaku, permukaan daun adaksial mengkilap dan tangkai daun panjang. Bunga berbentuk malai, berumah dua, hitam dan kecil (Supriadi dkk, 2001). Tumbuhan yang dilestarikan di Taman Nasional Meru Betiri, Jember ini (Hasanah, 2013), batangnya mengandung senyawa berberin klorida, 8-hidroksiberberin, jatrorrhizin, limasina, palmatin yang semuanya termasuk senyawa alkaloid (Siwon, 1982). Secara empiris batang kayu kuning dimanfaatkan untuk pengobatan berbagai penyakit oleh masyarakat. Berdasarkan penelitian Perry dan Metzger tahun 1980, batang dan akar kayu kuning telah digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai tonikum, sakit kuning, diare dan sakit kulit (Keawpradub, dkk., 2005).

Berberine dapat digunakan untuk mencegah berbagai penyakit metabolit yang berkaitan dengan kelainan jantung, aktivitas antiinflamasi dan antiproliferasi (Arrogo and Sibel, 2009). Ekstrak metanol *A. flava* menunjukkan aktivitas antioksidan dan sitotoksik terhadap larva udang dan sel kanker payudara MCF-7 terbesar dibandingkan ekstrak petroleum eter, kloroform, dan airnya, maupun jika dibandingkan dengan ekstrak *Coscinium blumeinum* dan *Fibraurea tinctoria*. Aktivitas ini diduga disebabkan oleh kandungan berberin di dalamnya (Keawpradub *et al.*, 2005). Berberin juga memiliki aktivitas hepatoprotektor (Singh *et al.*, 2010), antidiabetes mellitus (Zhang *et al.*, 2010)

Senyawa difuranoterpen *A. flava* telah terbukti memiliki aktivitas anti jamur (Suzuki *et al.*, 2011).



Gambar 2.1 Tanaman Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* Merr)

2.2 Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) didefinisikan sebagai kelompok penyakit metabolik yang ditandai terjadinya hiperglikemia. Penyakit ini berkaitan dengan abnormalitas metabolisme karbohidrat, protein dan lemak serta dapat menimbulkan beberapa komplikasi baik komplikasi mikrovaskular maupun makrovaskular, seperti retinopati, nefropati, neuropati maupun penyakit kardiovaskular. Diabetes mellitus diklasifikasikan menjadi 2 tipe utama yaitu DM tipe 1 dan DM tipe 2. DM tipe 1 terjadi pada 10% kasus, yang disebabkan karena defisiensi insulin karena adanya kerusakan sel beta pankreas, sedangkan DM tipe 2 terjadi pada sekitar 90% penderita, disebabkan karena gangguan sekresi insulin dan resistensi insulin. (Triplitt *et al.*, 2008).

Resistensi insulin merupakan suatu kondisi dimana sel beta pankreas mampu menghasilkan insulin, tetapi jaringan target seperti jaringan otot, jaringan adiposa dan hati tidak dapat merespon insulin tersebut, sehingga terjadi gangguan terhadap pengambilan glukosa yang ada dalam darah. Terjadinya resistensi insulin menyebabkan peningkatan produksi insulin sehingga terjadi hiperinsulinemia (Stoppler, 2012).

2.3 Resiko Penyakit Kardiovaskular pada DM

Penderita diabetes mellitus beresiko mengalami komplikasi penyakit kardiovaskular karena adanya kerusakan endotel pembuluh darah yang dapat secara langsung disebabkan oleh tingginya kadar glukosa darah ataupun metabolitnya, juga tingginya kadar asam lemak bebas dalam darah (Triplitt *et al.*, 2008).

Resistensi insulin pada DM tipe 2 juga berkaitan dengan resiko terjadinya penyakit kardiovaskular. Pada kondisi ini, insulin tidak mampu menghambat *hormon sensitive lipase*, sehingga terjadi peningkatan lipolisis. Meningkatnya lipolisis menyebabkan asam lemak bebas dalam darah meningkat dan terjadi hiperlipidemia. Adanya kerusakan endotel pembuluh darah disertai hiperlipidemia, meningkatkan resiko terjadinya penyakit jantung pada pasien diabetes mellitus (Moreira and Hamadeh, 2010).

2.4 Uji Toksikologi

Dalam penelitian dan pengembangan obat dari bahan alam, selain memperhatikan efektivitasnya, juga toksisitas dari obat bahan alam tersebut. Uji toksisitas terdiri dari 2 jenis, yaitu uji toksisitas umum dan uji toksisitas khusus.

a. Uji toksisitas umum, terdiri dari :

1. Uji toksisitas akut

Yaitu uji toksisitas untuk melihat efek ketoksikan obat pada pemberian dosis tunggal (sekali pemejanan), dalam waktu 24 jam. Uji toksisitas akut dilakukan terhadap 4-6 kelompok hewan uji dengan pemejanan melalui jalur yang paling sering digunakan oleh manusia (Depkes, 2000). Pengamatan terhadap efek toksik dapat dilakukan sampai 7-14 hari. Potensi ketoksikan akut dinyatakan dengan nilai LD₅₀.

2. Uji toksisitas sub kronik

Uji toksisitas subkronik bertujuan untuk menentukan potensi ketoksikan obat pada pemberian berulang yang diberikan dalam jangka waktu 3 bulan.

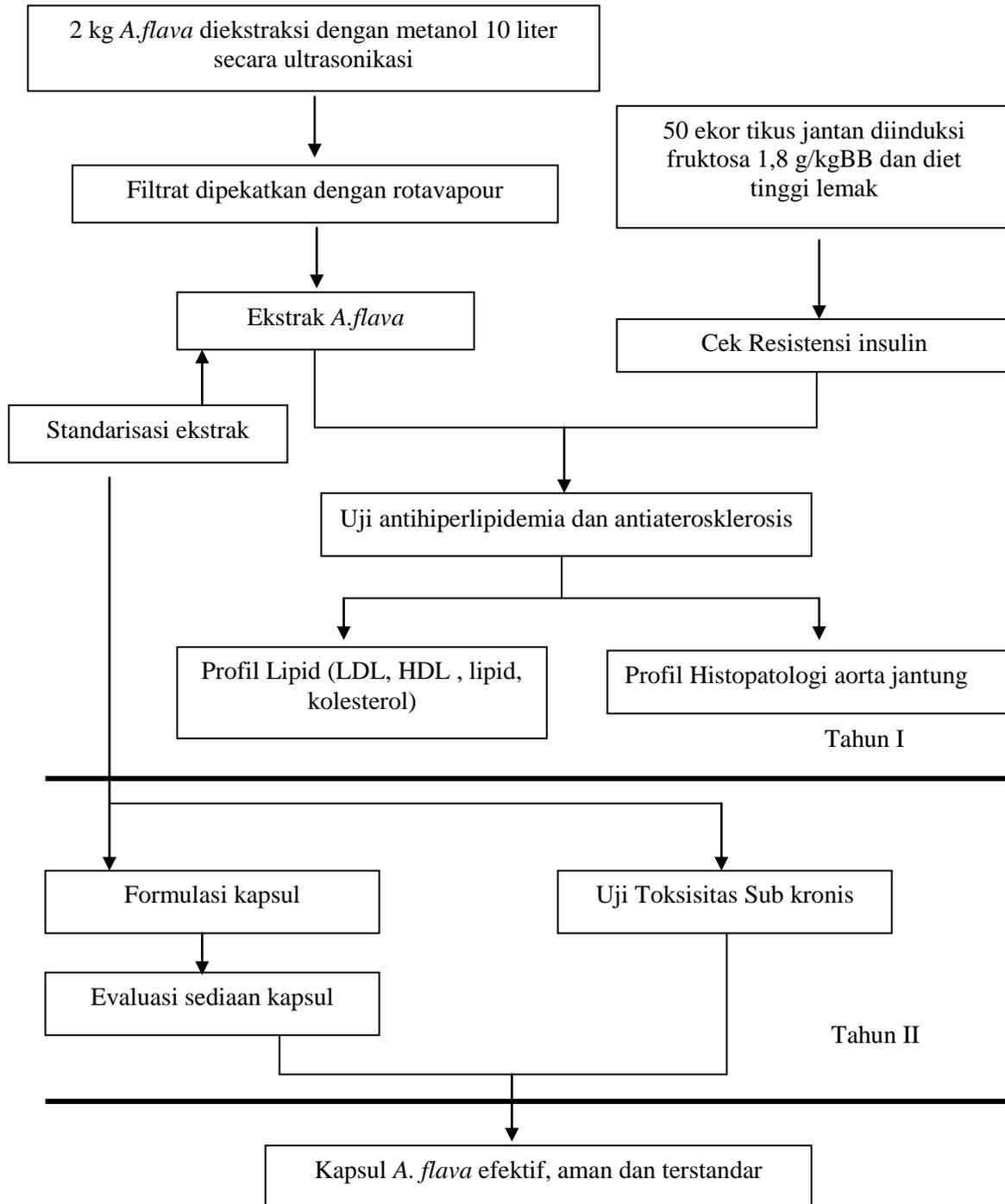
3. Uji toksisitas kronik

Uji toksisitas kronik dilakukan untuk menentukan potensi ketoksikan pada pemberian senyawa obat pada jangka waktu 6 bulan atau sepanjang usia hewan uji.

b. Uji toksisitas khusus dirancang untuk mengevaluasi secara rinci efek toksik yang khas suatu senyawa atas fungsi organ atau kelenjar tertentu pada aneka ragam subyek atau hewan uji. Termasuk dalam uji ketoksikan khas ini meliputi uji potensiasi, uji reproduksi, uji kemutagenikan, uji kekarsinogenikan, uji kulit dan mata, serta uji perilaku.

BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Farmakologi, dan Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember Tahapan penelitian adalah sebagai berikut:



Gambar 3.1 Tahapan Penelitian

Tahapan Penelitian

No	Eksperimen	Luaran	Parameter	Lokasi
1	Pembuatan ekstrak	Ekstrak metanol <i>A. flava</i>	Rendemen ekstrak	Lab fitokimia FF Univ Jember
2	Uji aktivitas antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis	Kemampuan untuk menurunkan lipid dan mencegah pembentukan plak aterosklerosis	LDL, HDL, lipid, kolesterol, profil histopatologi aorta jantung	Lab farmakologi fak farmasi Univ Jember
3.	Standarisasi ekstrak	Ekstrak terstandar	Susut pengeringan, organoleptik, kadar ,senyawa yang terlarut dalam pelarut air dan etanol, profil kromatogram, flavonoid total, kadar berberin	Lab fitokimia FF Univ Jember
4	Uji Toksisitas Sub kronis	Tingkat keamanan ekstrak	Berat badan, gejala fisik, hematologi, fungsi organ dan histopatologi hepar dan ginjal	Lab farmakologi fak farmasi Univ Jember
5	Formulasi dan evaluasi sediaan	Kapsul ekstrak yang memenuhi persyaratan FI	Keseragaman bobot, kadar senyawa marker (berberin)	Lab farmasetika FF Univ Jember

3.1 Tahun Pertama

3.1.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu : 8 Bulan.

Tempat Penelitian : Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi dan Laboratorium Biomedik Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Universitas Jember.

3.1.2 Alat dan Bahan

A. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, maserator, rotavapor, timbangan gram kasar, timbangan analitis, *holder* tikus, sonde oral, spuit injeksi, alat-alat bedah, tabung microsentrifuge, sentrifuge, bioanalizer, mikroskop.

B. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Untuk pembuatan ekstrak : simplisia kayu kuning, petroleum eter, kloroform, metanol.
- b. Untuk penetapan kadar berberin : berberin standar, silica gel 60 F₂₅₄, kloroform, metanol.
- c. Untuk menginduksi diabetes dan hiperkolesterol : fruktosa dosis 1,8 g/kg BB per hari, lemak kambing, kuning telur.
- d. Untuk pemeriksaan kadar glukosa darah : kit reagen fluidtest glukosa darah.
- e. Untuk pengujian aktivitas antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis ekstrak kayu kuning : CMC Na, ekstrak kayu kuning, kit reagen fluidtest kolesterol-HDL-LDL-TG.
- f. Lain-lain : pakan hewan, aquades untuk minum hewan uji.

3.1.3 Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur Wistar dengan usia lebih lebih dari 3 bulan dan berat badan antara 200-300 gram.

3.1.4 Cara Kerja Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak

Bahan yang digunakan adalah tanaman kayu kuning yang diperoleh dari Taman Nasional Meru Betiri telah diidentifikasi di Herbarium Jemberiense, Jurusan Biologi, MIPA Universitas Jember. Sebanyak 2 kg batang kayu kuning dikeringkan dengan cara diangin-anginkan untuk mendapatkan simplisia. Simplisia yang dihasilkan, selanjutnya diblender dan diayak sehingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk diekstraksi dengan ultrasonikasi menggunakan pelarut metanol selama 1 jam. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong Buchner sehingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi ulang dengan cara yang sama sebanyak tiga kali. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak metanol selanjutnya diuji aktivitasnya sebagai antihiperlipidemia.

b. Uji Aktivitas Antihiperlipidemia dan anti ateroklerosis

Tikus tersebut dibuat diabetes dan hiperkolesterol dengan cara diinduksi dengan fruktosa 1,8 gram/kg BB serta diberi pakan tinggi lemak diberikan selama 50 hari. Sebanyak 40 ekor tikus Wistar diabetes-hiperkolesterol tersebut dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing terdiri dari 10 ekor tikus. Pada masing-masing kelompok hewan uji diberikan perlakuan sebagai berikut. Kelompok 1 sebagai kelompok kontrol

diberikan CMC Na 0,5 ml/ekor, kelompok 2 diberikan perlakuan dengan simvastatin dosis 0,9/kg BB tikus, kelompok 3 diberi ekstrak kayu kuning dosis 250 mg/kg BB dan kelompok 4 diberikan ekstrak kayu kuning dosis 500 mg/kg BB. Perlakuan diberikan pada hari ke 51 sampai dengan hari 64.

Pemeriksaan profil lipid hewan uji dilakukan pada hari ke-65. Pengambilan darah dilakukan dari vena ekor tikus. Pengamatan dilakukan terhadap kadar kolesterol total, LDL, HDL dan trigliserida tikus. Untuk melihat aktivitas anti aterosklerosis dari ekstrak kayu kuning, dilakukan pemeriksaan histologi pembuluh aorta jantung tikus. Pembuatan preparat histologi aorta jantung dilakukan dengan pengecatan dengan hematoksilin-eosin.

Pengukuran Profil Lipid

Setelah perlakuan ekstrak kayu kuning pada tikus selama 14 hari, pengukuran kadar kolesterol total dilakukan pada hari ke 15 untuk setiap tikus pada masing-masing kelompok. Darah tikus diambil dari vena ekor tikus dan ditampung dengan tabung mikrosentrifuge sebanyak 3-5 ml. Darah didiamkan selama 15 menit dan disentrifus selama 20 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

Serum darah dipipet dengan pipet mikro masing-masing sebanyak 0,5 ml dan dimasukkan dalam 4 tabung mikrosentrifuse, kemudian masing-masing tabung ditambahkan reagen fluidtest kolesterol, TG, LDL dan HDL sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan vortex selama 5 menit. Ukur kadar kolesterol total, TG, LDL dan HDL pada alat bioanalyzer.

Pemeriksaan histologi pembuluh aorta jantung tikus

Tikus yang telah diambil darahnya untuk pemeriksaan profil lipid, dilakukan pembedahan untuk dilihat histologi pembuluh aortanya. Masing-masing kelompok, diambil 3 ekor tikus untuk dibedah. Organ tikus yang terdiri dari jantung, aorta dan hati diambil pada hari terakhir perlakuan untuk dibuat preparat histopatologi organ dalam formalin 10%. Analisis preparat histopatologi dilakukan dengan pengecatan hematoksilin eosin (HE) dan dicek ada tidaknya atherromatous plaque di aorta dan degenerasi melemak di hati. Preparat histopatologi disiapkan dengan cara: fiksasi, dehidrasi dan *clearing*, *embedding*, *blocking*, pemotongan, pengecatan/pewarnaan dan *mounting*. Dehidrasi dan *clearing* organ dilakukan dengan memasukkan jaringan luka ke dalam alkohol dengan konsentrasi 70%, 80%, 95%, 96%, alkohol absolut I, II, III,

xylol I, II dan III masing-masing selama 30 menit. Kemudian dilakukan proses pelekatan organ dengan parafin (*embedding*) yaitu dengan memasukkan organ ke dalam parafin I yang masih cair, kemudian dimasukkan ke dalam oven suhu 55 – 56 0C selama 30 menit dan diulangi lagi dengan parafin II dengan suhu oven 60 0C. Hasil *embedding* kemudian dibuat balok parafin (*blocking*) dengan menggunakan cetakan besi. Setelah parafin membeku dilakukan pemotongan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom dengan ketebalan 4 – 7 μm . Hasil potongan dimasukkan ke dalam *water bath* dengan suhu 42-45 0C sampai jaringan mengembang kemudian dikeringkan dengan *hot plate*. Pewarnaan organ hepar menggunakan Hematoxylin Eosin (HE) yang dilakukan setelah jaringan yang kering dimasukkan ke dalam xylol I, II dan III, masing masing selama 5, 4, dan 3 menit. Jaringan selanjutnya dimasukkan ke dalam alkohol absolut I (3 menit), alkohol absolut II (2 menit), dan alkohol absolut III (3 menit), alkohol 95% (2 menit), alkohol 90% (2 menit), alkohol 80% (1 menit), alkohol 70% (1 menit), dan dicuci dengan air kran mengalir selama 5 menit. Proses selanjutnya jaringan dimasukkan ke dalam zat warna hematoxylin selama 4-10 menit kemudian dicuci dengan air kran mengalir selama 10 menit, jaringan dimasukkan ke dalam eosin selama 3-8 menit kemudian dimasukkan berturut-turut ke dalam alkohol 70% (1 menit), 80% (2 menit), 90% (3 menit) dan alkohol absolut I (3 menit), alkohol absolut II (3 menit) dan alkohol absolut III (3 menit). Selanjutnya jaringan dimasuk kedalam xylol I (3 menit), xylol II (4 menit) dan xylol III (5 menit). Proses terakhir adalah *mounting* yaitu penutupan gelas obyek dengan gelas penutup yang sebelumnya telah ditetesi menggunakan entellan atau kanada balsem. Pengamatan histopatologi dilakukan secara deskriptif yang meliputi hipereremi, edema, perdarahan, reepitelisasi, pembentukan jaringan ikat serta jumlah sel radang neutrofil dan neovaskularisasi (Cheng *et al.*, 2005; Winarsih dkk, 2007). Penghitungan dilakukan pada 5 lapangan pandang dengan pembesaran 10x40

c. Standarisasi Ekstrak

Standarisasi ekstrak dilakukan sesuai dengan prosedur dalam Parameter Standar Umum ekstrak tumbuhan obat yang diterbitkan oleh Departemen Kesehatan RI (2000). Standarisasi dilakukan terhadap beberapa parameter. Pertama parameter non spesifik, yakni susut pengeringan. Kedua parameter spesifik yang meliputi organoleptik, kadar senyawa yang terlarut dalam pelarut air dan etanol. Ketiga parameter kandungan kimia ekstrak yang meliputi pola kromatogram dan kadar total golongan kandungan kimia dan penentapak kadar senyawa marker berberin.

1) *Parameter Susut Pengerinan*

Tujuan pengukuran susut pengerinan adalah memberikan batasan maksimal tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan. Ekstrak ditimbang secara seksama sebanyak 1 – 2 gram dan dimasukkan ke dalam botol timbang dangkal bertutup yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105 °C selama 30 menit dan telah ditara. Sebelum ditimbang ekstrak diratakan hingga merupakan lapisan setebal 5 – 10 mm. Kemudian dikeringkan pada suhu 105 °C hingga bobot tetap, hitung susut pengerinannya dalam persen.

2) *Organoleptik*

Tujuan pemeriksaan organoleptik adalah pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin. Pemeriksaan menggunakan panca indera untuk mendeskripsikan bentuk, warna, bau, dan rasa. Pemeriksaan dilakukan oleh paling sedikit 20 orang.

3) *Kadar Senyawa yang Terlarut dalam Air dan Etanol*

Tujuan penentuan kadar senyawa yang larut dalam air dan etanol adalah memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan. Maserasi sejumlah 5 gram ekstrak selama 24 jam dengan 100 ml air kloroform menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Saring, uapkan 20 ml filtrat hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara, panaskan residu pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal. Hal yang sama dilakukan dengan mengganti pelarutnya dengan etanol.

4) *Pola Kromatogram*

Pola kromatogram dapat memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram. Pola kromatogram ditentukan dengan metode KLT-densitometri pada lempeng silika gel GF₂₅₄, fase gerak heksana-etil asetat (81:19). Setelah *discan* dengan densitometer, bercak yang ada dideteksi dengan anisaldehyd asam sulfat untuk mengetahui bercak yang mengandung terpenoid yang ditunjukkan dengan timbulnya warna bercak yang berkisar antara biru sampai ungu.

5) *Kadar Total Golongan Kandungan Kimia*

Pada penetapan kadar total golongan kandungan kimia, yang ditetapkan adalah kadar total flavonoid. Kadar total flavonoid dilakukan dengan mereaksikan reagen Folin Ciocalteu (50%) ditambahkan 1 mL Natrium karbonat (7,5%) dan 450 uL sampel uji.

Campuran didiamkan 30 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600 nm. Standar yang digunakan untuk pengujian adalah asam Galat

6) *Penetapan Kadar Berberin*

Penetapan kadar berberin dalam ekstrak metanol *A. flava* dilakukan dengan metode KLT densitometri berdasarkan penelitian Keawpradub *et al.* (2005) dengan sedikit modifikasi. Fase diam yang digunakan adalah lempeng silica gel 60 F245, dan fase gerak berupa campuran kloroform metanol (6 : 1). Adanya berberin dideteksi dengan penampak bercak lampu uv dan dibandingkan dengan standar. Berberin standar digunakan sebagai pembanding berdasarkan nilai Rf, sedangkan kadar berberin dalam ekstrak metanol *A. flava* dihitung berdasarkan kurva baku berberin standar.

3.2 Tahun Kedua

3.2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu : 8 Bulan.

Tempat Penelitian : Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi dan Laboratorium Biomedik Bagian Farmakologi dan Farmasi Klinik Universitas Jember.

3.2.2 Alat dan Bahan

A. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, maserator, rotavapor, timbangan gram kasar, timbangan analitis, *holder* tikus, sonde oral, spuit injeksi, alat-alat bedah, tabung microsentrifuge, sentrifuge, bioanalizer, mikroskop.

B. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- a. Untuk pembuatan ekstrak : simplisia kayu kuning, petroleum eter, kloroform, metanol.
- g. Untuk uji toksikologi : kit reagen fluidtest ALT, AST, bilirubin, kloroform, formalin 10%.
- b. Lain-lain : pakan hewan, aquades untuk minum hewan uji.

3.2.3 Hewan Uji

Hewan uji toksisitas akut digunakan mencit galur Balb-c dengan berat badan 20-30 gram. Sedangkan untuk uji toksisitas subkronik digunakan tikus putih galur Wistar dengan usia lebih lebih dari 3 bulan dan berat badan antara 200-300 gram.

3.2.4 Cara Kerja Penelitian

a. Uji Toksisitas Ekstrak Kayu Kuning

Uji Toksisitas Sub Kronik

Uji toksisitas subkronik dilakukan dengan menggunakan tikus jantan galur Wistar. Sebanyak 40 ekor tikus jantan dibagi secara random menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 10 ekor mencit. Masing-masing diberi perlakuan sebagai berikut :

- Kelompok I : Diberi suspensi CMC Na
- Kelompok II : Diberi ekstrak kayu kuning dosis 125 mg/kg BB
- Kelompok III : Diberi ekstrak kayu kuning dosis 250 mg/kg BB
- Kelompok IV : Diberi ekstrak kayu kuning dosis 500 mg/kg BB

Pemberian ekstrak kayu kuning dilakukan selama 28 hari, dan pada akhir perlakuan dilakukan pengambilan darah untuk pemeriksaan parameter kerusakan hati (aktivitas ALT dan AST). Selain itu dilakukan pembedahan untuk melihat gambaran histologi hepar dan ginjal tikus. Pembuatan preparat histology seperti pada tahun pertama.

b. Formulasi Sediaan Kapsul

Ekstrak ditambah bahan pengering Cab-o-sil (2-10%) dicampur hingga homogen dalam mortir, kemudian ditambahkan bahan pengisi avisel dan dicampur hingga homogen. Campuran serbuk dimasukan ke dalam cangkang kapsul.

c. Uji Mutu Sediaan Kapsul

Kapsul yang dihasilkan diuji sifat fisiknya meliputi: keseragaman bobot dan kadar berberine yang ada

Pemeriksaan Keseragaman Bobot kapsul

Ditimbang 20 kapsul satu per satu, kemudian isi dikeluarkan dari cangkang dan cangkang keseluruhan ditimbang. Perbandingan bobot rata-rata tiap kapsul dengan bobot kapsul harus memenuhi persyaratan. Persyaratan yang ditentukan, tidak boleh lebih dari dua kapsul yang masing-masing bobotnya menyimpang dari harga yang ditetapkan kolom A, dan tidak satu kapsul pun yang bobotnya menyimpang dari bobot rata-ratanya lebih dari yang ditetapkan pada kolom B (lihat Tabel 3.2) (Depkes RI, 1979).

Tabel 3.2 Persyaratan Penyimpangan Bobot Tablet

Bobot rata-rata	Penyimpangan bobot rata-rata (%)	
	A	B
25 mg – 150 mg	10 %	20 %
151 mg -300 mg	7.5 %	15 %
Lebih dari 300 mg	5 %	10 %

Penetapan kadar berberin dalam kapsul

Penetapan kadar berberin dilakukan dengan cara mengambil 5 kapsul ekstrak A. flava dikeluarkan isinya dilarutkan ke dalam etanol sampai 10 mL menggunakan labu ukur. Kadar berberin ditentukan secara KLT densitometri dengan kondisi seperti pada penetapan kadar tahun kedua.

d. Analisis data

Data berat badan, parameter hematologi, urin, serta fungsi organ antara kelompok perlakuan dan data keseragaman bobot selanjutnya uji ANAVA satu arah. Apabila terjadi perbedaan secara signifikan maka akan dilanjutkan dengan LSD (*Least Significant Difference*). Sedangkan data histopatologi hepar dan ginjal antara kelompok perlakuan dianalisis secara deskriptif kualitatif. Kadar berberin di tentukan dengan ekstrapolasi kurva baku berberin

BAB 4. BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN

Biaya yang diperlukan untuk pelaksanaan penelitian ini adalah sebagai berikut

No.	Uraian	Jumlah	
		Tahun I	Tahun II
1.	Gaji dan Upah	16.900.000	16.900.000
2.	Bahan Habis Pakai dan Peralatan	46.900.000	41.900.000
3.	Perjalanan	10.200.000	10.200.000
4.	Lain-lain	1.000.000	1.000.000
	Jumlah Biaya	75.000.000	70.000.000

Penelitian secara efektif dilakukan 8 bulan untuk setiap tahunnya, termasuk pembuatan laporan dengan jadwal sebagai berikut

Tahun I

No .	Kegiatan	Tempat kegiatan	Bulan ke-							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Pembuatan simplisia	Lab. Fitokimia-Farmasi UNEJ	■							
2.	Pembuatan ekstrak kayu kuning	Lab. Fitokimia-Farmasi UNEJ	■	■						
3.	Uji aktivitas antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis	Lab Farmakologi FF UNEJ			■	■	■			
4.	Standarisasi Ekstrak	Laboratorim Fitokimia FF UNEJ					■	■		
5	Analisis Data	FF Unej						■	■	
6	Pembuatan Laporan	FF Unej								■

Tahun 2

No .	Kegiatan	Tempat kegiatan	Bulan ke-							
			1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Pembuatan simplisia	Lab. Fitokimia-Farmasi UNEJ	■							
2.	Pembuatan ekstrak kayu kuning	Lab. Fitokimia-Farmasi UNEJ	■	■						
3.	Uji Toksisitas Sub kronis	Laboratorim Farmakologi FF UNEJ			■	■	■	■		
4	Analisis Data	FF Unej						■	■	
5	Pembuatan Laporan	FF Unej								■

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pembuatan Simplisia Kayu Kuning

Batang kayu kuning diambil pada siang hari di kawasan Taman Nasional Meru Betiri Desa Andongrejo Kecamatan Tempurejo Kabupaten Jember. Batang yang diambil adalah batang yang bagian dalam (kayu)nya berwarna kuning. Sampel

tumbuhan kemudian dibersihkan dan diangin-anginkan selama 7 hari dan dipotong kecil kurang lebih 1 cm. Batang ditumbuk kemudian digiling hingga menjadi serbuk halus. Serbuk ditimbang dan disimpan dalam wadah. Dari proses tersebut didapatkan serbuk simplisia sebanyak 440 gram (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Batang dan simplisia Kayu Kuning.

5.2 Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 400 gram simplisia ditambahkan 2 liter metanol p.a kemudian diekstraksi menggunakan ultrasonik selama 1 jam. Filtrat kemudian dipisahkan dari ampasnya menggunakan corong Buchner. Ampas ditambahkan metanol sebanyak 2 liter dan diultrasonikasi kembali selama 1 jam. Filtrat hasil ekstraksi kedua dikumpulkan dengan filtrat pertama kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan rotavapour hingga diperoleh ekstrak kental. Dari 2,65 liter filtrat, didapatkan hasil akhir ekstrak kental sebanyak 6,25 gram atau rendemen sebesar 1,56% b/b.

5.3 Standarisasi Ekstrak

Ekstrak kayu kuning yang diperoleh selanjutnya distandarisasi. Parameter yang ditentukan adalah susut pengeringan, kadar flavonoid dan kadar berberin. Hasil standarisasi ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil Standarisasi Ekstrak *A.flava*

Parameter	Nilai
Organoleptis	Kental, coklat, rasa pahit sepat, bau khas
Susut Pengeringan	1,68 ± 0,07% b/b
Kadar flavonoid total	7,05 ± 0,26 mgQE
Kadar Berberin	0,31 ± 0,04% b/b

5.4 Profil Lipid

Parameter penting untuk menentukan profil lipid di dalam darah yaitu kolesterol total, trigliserida, LDL dan HDL. Hasil pemeriksaan profil lipid seluruh kelompok yang meliputi kadar rata-rata kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL dapat dilihat pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil Pemeriksaan Profil Lipid

Kelompok Perlakuan	Kadar Rerata (mg/mL) ± SD			
	Kolesterol	Trigliserida	LDL	HDL
Kontrol Normal	86,19 ± 3,6	93,68 ± 3,6	57,3±9,2	50,33±4,4
Kontrol (-)	167,93 ±4,5	213,19 ±5,7*	51,1±14,2	17,29±13,1
Kontrol (+)	106,05 ± 3,8*	156,13 ±3,5*	87,05±31,9*	31,64±3,1*
Dosis 250 mg/KgBB (K1)	136,38 ±2,0*	176,31 ±2,0*	91,49±23,7*	43,96±12,3*
Dosis 500 mg/KgBB (K3)	130,02 ± 2,4*	175,69 ±2,4*	61,17±28,8	25,76±3,4*

*berbeda signifikan dengan kontrol (-), p<0,05, n= 4

Pemberian diet tinggi lemak pada tikus mampu meningkatkan profil lipid pada kelompok kontrol (Tabel 5.2). Asam lemak jenuh yang berasal dari minyak goreng dan kuning telur menyebabkan peningkatan jumlah asetil-koA di dalam sel hati untuk menghasilkan kolesterol (Murray *et. al.*, 2003). Peningkatan ini menyebabkan kadar LDL juga meningkat karena LDL merupakan lipoprotein pengangkut kolesterol terbesar pada darah manusia. Diet asam lemak jenuh akan menekan sintesis HDL melalui

penurunan kadar apolipoprotein A-1 yang merupakan prekursor untuk pembentukan HDL (Murray *et. al.*, 2003).

Berdasarkan hasil penelitian terlihat adanya penurunan kadar kolesterol, trigliserida pada serum darah tikus yang diberi ekstrak kayu kuning dibandingkan dengan kontrol negatif (Tabel 5.1). Besarnya penurunan kadar kolesterol dan trigliserida dari kelompok dosis 250, dan 500 mg/kgBB secara berturut turut adalah 7,92% dan 11,41% untuk kolesterol, 8,48% dan 10,73% untuk trigliserida. Profil LDL tikus mengalami kenaikan 15,04% untuk kelompok dosis 250mg/KgBB dan mulai menurun pada dosis 500 mg/KgBB sebesar 20,87%. Ekstrak kayu kuning hanya mampu meningkatkan HDL pada dosis 250 mg/KgBB sebesar 53,03% dan turun pada dosis 500 mg/KgBB sebesar 37,91%.

Penurunan kadar kolesterol dan LDL dalam serum tikus dapat disebabkan adanya senyawa berberin pada kayu kuning yang memiliki aktivitas antihiperlipidemia melalui hambatan aktivasi AMP kinase (Brusq *et al.*, 2006). Ekstrak kayu kuning juga memiliki flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi LDL.

5.5 Histopatologi Aorta

Pengamatan gambaran histopatologi aorta menunjukkan adanya sel busa sebagai parameter aterosklerosis. Hasil histopatologi dan penghitungan jumlah sel busa disajikan pada gambar 5.2-5.4 dan tabel 5.3 berikut ini.

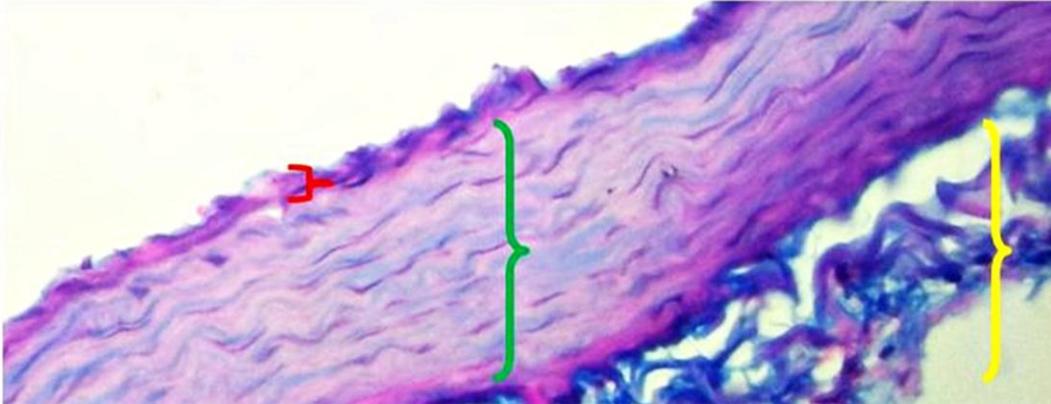
Tabel 5.3 Hasil penghitungan sel busa pada irisan aorta

Perlakuan	Kontrol Normal	Kontrol (-)	Kontrol (+)	Dosis 250 mg/KgBB (K1)	Dosis 500 mg/KgBB (K2)
1	0	60	2	11	10
2	0	100	4	5	5
3	0	8	5	6	0
4	0	40	2	2	5
Rerata	0	52	3,25*	6*	5*

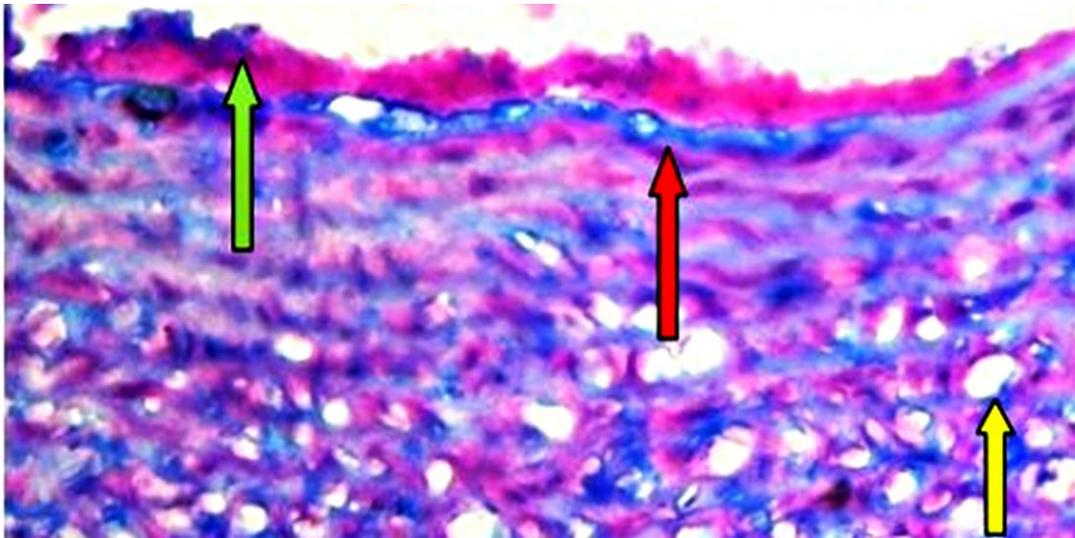
*berbeda signifikan dengan kontrol (-), $p < 0,05$, $n = 4$

Tabel 5.3 menunjukkan jumlah sel busa kelompok kontrol negatif paling besar, yaitu sebesar 52 sel. Hasil pengujian statistik menggunakan metode Kruskal-Wallis didapatkan hasil terdapat perbedaan jumlah sel busa yang bermakna diantara kelima

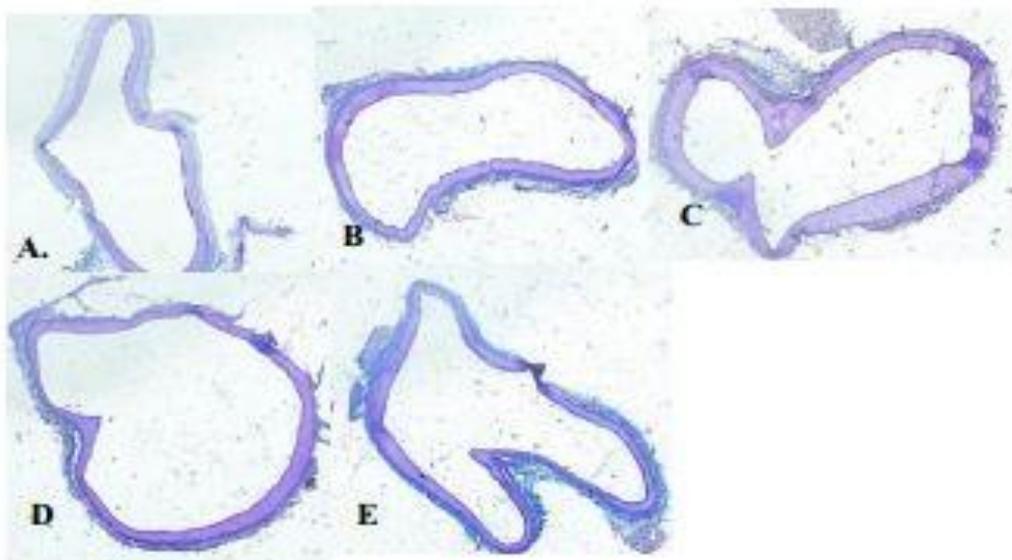
kelompok perlakuan ($p < 0,05$). Hasil uji Mann Whitney menunjukkan semua kelompok berbeda bermakna dibandingkan dengan kontrol negatif.



Gambar 5.2 Gambar histopatologi aorta norma pada pembesaran 400x. Tanda merah (tunika intima), tanda hijau (tunika media) dan tanda kuning (tunika adventitia)



Gambar 5.3. Gambar histopatologi aorta kelompok kontrol negatif pada pembesaran 400x. Sel busa tempat pada tunika intima (panah merah), tunika media (panah kuning) dan perdarahan pada lumen (panah hijau)



Gambar 5.4. Gambar Histopatologi Aorta dengan pewarnaan MT. (A) kontrol normal, (B) Kontrol positif, (C) Kontrol negatif dengan penebalan dinding aorta yang terlihat jelas, (D) Dosis 250mg/kgBB, (E) Dosis 500mg/kgBB

Sel busa (*foam cells*) adalah makrofag dan sel-sel otot polos yang menjadi terisi dengan ester kolesterol dan merupakan karakteristik komponen seluler dalam plak aterosklerotik (Katzung, 2002). Berdasarkan hasil pengamatan, dapat diketahui bahwa kelompok kontrol negatif memiliki rata-rata jumlah sel busa yang paling banyak, yaitu 52 sel busa per ekor tikus. Hal ini membuktikan bahwa pemberian diet tinggi lemak dan fruktosa dapat memicu timbulnya sel busa yang dapat berkembang menjadi lesi aterosklerosis. Ekstrak *A. flava* terbukti mampu menurunkan jumlah sel busa dibandingkan kelompok kontrol negatif. Peningkatan dosis ekstrak metanol *A. flava* yang diberikan sebanding dengan penurunan jumlah sel busa dibandingkan dengan kelompok kontrol.

Berdasarkan hasil pengamatan terjadi penebalan tunika intima dan tunika media yang dapat disebabkan oleh adanya sel busa, perdarahan, dan fibrosis. Penebalan tunika intima dan tunika media pada masing-masing kelompok perlakuan sebanding dengan banyaknya sel busa. Semakin banyak jumlah sel busa maka semakin besar pula penebalan tunika yang terjadi. Penebalan tunika berbanding terbalik dengan besarnya dosis yang diberikan. Semakin besar dosis ekstrak metanol daun *A. flava* maka semakin sedikit penebalan yang terjadi.

Penurunan jumlah sel busa dan pengurangan penebalan tunika pada kelompok perlakuan diduga terjadi karena efek proteksi berberin pada oksidasi LDL. Berberin juga menunjukkan aktivitas antiproliferatif terhadap sel otot polos vaskuler (VMSC) yang penting dalam pencegahan aterosklerosis karena penyakit ini dapat bermula dari migrasi VMSC, proliferasi ke endomembran dan pembentukan sel busa setelah menelan lipid (Wu *et al.*,2010). Selain itu, adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol daun *A. flava* berperan sebagai antioksidan yang dapat menghambat oksidasi LDL. Hal ini menyebabkan keutuhan endotel pembuluh darah terjaga dan mengurangi resiko terjadinya aterosklerosis (Nijvelt, 2001).

Pemberian ekstrak metanol daun *A. flava* terbukti dapat memperbaiki gambaran histopatologi aorta tikus Wistar hiperlipidemia yang diinduksi fruktosa dan diet tinggi lemak. Hal ini terjadi akibat adanya kandungan berberin dan flavonoid yang berperan sebagai antioksidan sehingga dapat menghambat sintesis dan oksidasi lipid serta menjaga keutuhan endotel pembuluh darah.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian kesimpulan yang dapat diambil adalah:

- a. Ekstrak kayu kuning mampu menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL
- b. Ekstrak *A flava* dosis 250 mg/KgBB mampu meningkatkan kadar HDL
- c. Ekstrak *A flava* memiliki aktivitas antiaterosklerosis melalui kemampuan penurunan jumlah sel busa dan penebalan tunika
- d. Susut pengeringan, kadar flavonoid dan kadar berberin ekstrak kayu kuning secara berturut turut 1,68%; 7,05 mgQE dan 0,31 %b/b.

6.2 Saran

Dari hasil penelitian tersebut, perlu dilakukan dilanjukajan dengan pengawatan secara imunohistokimia untuk mengetahui mekanisme ekstrak *A flava* dan pengujian toksisitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam., J.M.F., 2005. Komplikasi Kronik Diabetik Masalah Utama Penderita Diabetes dan Upaya Pencegahan. *Suplement* Vol 26 N0.3 Juli-September 2005
- Arrigo FC & Sibel E. 2009. Metabolic and cardiovascular effects of berberine: from preclinical evidences to clinical trial results. *Clinical Lipidology* vol. 4(5): 553-563. <http://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/clp.09.41>
- Creager MA, Luscher TF, 2003. Diabetes and Vascular disease: Patophysiology, Clinical Consequences and Medical Therapy: Part I, *Circulation* 108
- Departemen Kesehatan RI, 2000. *Pedoman Pelaksanaan Uji Klinik Obat Tradisional*, Jakarta, Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Hasanah, M., 2013, Penelaahan terhadap Plasma Nutfah Khusus: Tanaman Obat, *Komisi Nasional Sumber Daya Genetik*, http://indoplasma.or.id/artikel/artikel_2005_penelaahan_pn_khusus.htm, diakses 14 Maret 2013
- Hayat, Patel, Khattar, and Malik. 2004. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment, *Clinical Science* **107**
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid III, terjemahan. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta.
- Katzung, Betram G. 2006. *Basic and Clinical Pharmacology 10th edition*. San Fransisco : Mc Graw Hill.
- Kazi, Afridi, Kazi N, Jamali, Arain, Jalbani, Kandhro, 2008, Copper, Chromium, Manganese, Iron, Nickel, and Zinc Levels in Biological Samples of Diabetes Mellitus Patients, *Biological Trace Element Research* , 122 (1)
- Keawpradub, N., Dej-adisai, S., and Yuenyongsawad, S., 2005, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Thai Medicinal Plants Named Khaminkhruea: *Arcangelisia flava*, *Cosciniu blumeanum*, and *Fibraurea tinctoria.*, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, 27 (Suppl. 2): 455-467
- Mc Guire KD, Diabetes and The Cardiovascular System, Braundwald's Heart Disease, 9 ed Elsevier, Philadelphia, 2012
- Moreira, T.S. and Hamadeh, M.J., 2010. The role of deficiency vitamin D in the pathogenesis of tipe 2 diabetes mellitus. *The Europe e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*. 5 : p 155-165
- Murray, R. K., Granner, & Rodwell. *Biokimia Harper*. Terjemaham oleh Andry Hartono. 2003. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Nagle Hinter and Barbara Nagle, 2005. *Pharmacology: An Introduction*, McGraw Hill, Boston, 256
- Nijveldt, Nood, Hoorn, Boelens, Norren, dan Leeuwen. 2001. Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Am J Clin Nutr*, 74:418–25.
- Siwon, J.. 1982, *A Pharmacognostical Study Of Some Indonesian Medicinal Plants Of The Family Menispermaceae*, Leiden, 73-79.
- Singh, A., Duggal, S., Kaur, N., Singh, J., 2010, Berberin: Alkaloid with Wide Spectrum of Pharmacological Activities, *Journal of Natural product*, **3**:64-75.
- Smeltzer, S. C. dan B. G. Bare. 2008. *Buku Ajar Keperawatan Medikal Bedah* Brunner & Suddarth. Jakarta: EGC
- Supriadi, dkk, 2001, *Tumbuhan Obat Indonesia: Penggunaan dan Khasiatnya*, xi, Pustaka Populer Obor, Jakarta, 6-8.
- Stoppler, M.C. 2012. *Insulin resistance*. medicinet.com diunduh pada 29 April 2014.

- Triplitt, C.L., Reasner, C.A., and Isley, W.A. 2008. Diabetes Mellitus. *In*: : Dipiro, J.T., Talbert, R.L., Yee, G.C., Matzke, G.R., Wells, B.G., Posey, L.M. (Eds.). *Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach*. Seventh Edition. New York: McGraw Hill Medical Publishing Division. p. 1205-15.
- Toshisada Suzuki T, Kiyotani, Maeda Katayama' Yokotani, Syafii, Muladi, 2011, Suzuki, Furanoditerpenes from *Arcangelisia flava* (L.) Merr. and their antifungal activity, *Phytochemistry Issue*, Volume 4,
- Tjokroprawiro, A., 2006. *Hidup Sehat dan Bahagia Bersama Diabetes Mellitus*. Jakarta: PT Gramedia Pustaka Utama, hal 2-3, 53.
- Wiyanto 1993. *Petunjuk Mengenai Tanaman di Indonesia dan Khasiatnya sebagai Obat Tradisional*, terj., Jilid 1, Yayasan Dana Sejahtera, Yogyakarta.
- Wu Min, Wang Jie, dan Liu Long-tao. 2010. Advance of Studies on Antiatherosclerosis Mechanism of Berberine. *Chin J Integr Med*,16(2):188-192
- Zhang,H, Wei, J, Xue, R, Wu, JD,Zhao W, Wang, Z, Wang S, Zhou, ZX, Song DQ, Wang YM, Pan, HN, Kong, WJ, Jiang JD, Berberine lowers blood glucose in type 2 diabetes mellitus patients through increasing insulin receptor expression, *Metabolism Clinical and Experimental* 59 (2010) 285–292,