

Pengaruh Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia
(*The Influence of Methanol Extract of Yellow Root (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) Leaves on Aortic Histopathology in Hyperlipidemic Wistar Rats*)

Yuniar Wahyu Rahmawati, Evi Umayah Ulfa, Ema Rachmawati
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: ywrahmawati@gmail.com

Abstract

Atherosclerosis is the leading cause of heart attack and stroke. Hyperlipidemia is one of the triggers of atherosclerosis through oxidative stress and formation of foam cells. Atherogenic index (the ratio of LDL/HDL) is a predictive parameter of coronary heart disease. A.flava is potential as antiaterosklerosis due to the content of berberine and flavonoids. This study was undertaken to determine the ability of methanolic extract of A.flava leaves (EMDAf) in lowering atherogenic index and the number of foam cells. Five groups experimental animals (each consisting of 4 rats) was induced with high fat and fructose diet for 45 days, followed by administration of EMDAf dose of 250 mg/kg BW, 500 mg/kg BW, 750 mg/kg BW, simvastatin 1.8 mg/kg BW (control (+)), and CMC Na 1% (control (-)) for 7 days treatments. Then the rat arcus aorta was taken for histopathological examination with Masson Trichrome staining. ANOVA test results showed that EMDAf could decrease the atherogenic index, but not significantly ($p > 0.05$). While the Kruskal Wallis test results showed that the increase dose of EMDAf might improve histopathology of the aorta through a reduction in the number of foam cells significantly compared to the negative control ($p < 0.05$). Berberine contents in EMDAf is 0.046% measured by TLC-densitometry. It could be concluded that methanolic extract of A.flava leaves had the ability to decrease in the atherogenic index value and the number of foam cells.

Keywords: *Arcangelisia flava* leaves, foam cells, atherogenic index, aorta, histopathology

Abstrak

Aterosklerosis merupakan penyebab serangan jantung dan stroke. Hiperlipidemia menjadi salah satu pemicu aterosklerosis melalui stress oksidatif dan pembentukan sel busa. Indeks aterogenik (rasio LDL/HDL) merupakan parameter prediksi penyakit jantung koroner. *Arcangelisia flava* berpotensi sebagai antiaterosklerosis dengan adanya kandungan berberin dan flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak metanol daun *A.flava* (EMDAf) dalam menurunkan indeks aterogenik dan jumlah sel busa. Lima kelompok hewan coba (masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus) diinduksi diet tinggi lemak dan fruktosa selama 45 hari, dilanjutkan dengan pemberian EMDAf dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, 750 mg/kg BB, simvastatin 1,8mg/kgBB (kontrol (+)), dan CMC Na 1% (kontrol (-)) selama 7 hari. Arcus aorta tikus diambil untuk pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan *Masson Trichrome*. Kadar LDL dan HDL diukur sebelum dan sesudah 7 hari perlakuan. Hasil uji ANOVA menunjukkan bahwa EMDAf mampu menurunkan indeks aterogenik namun belum signifikan ($p > 0.05$). Sedangkan hasil uji Kruskal Wallis memperlihatkan bahwa kenaikan dosis EMDAf dapat memperbaiki gambaran histopatologi aorta melalui penurunan jumlah sel busa yang signifikan dibanding kontrol negatif ($p < 0.05$). Kadar berberin dalam EMDAf sebesar 0,046% dengan metode KLT-densitometri. Berdasarkan hasil pengujian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol daun *A.flava* memiliki kemampuan memperbaiki gambaran histopatologi aorta melalui penurunan jumlah sel busa dan menurunkan nilai indeks aterogenik.

Kata kunci: daun *Arcangelisia flava*, sel busa, indeks aterogenik, aorta, histopatologi

Pendahuluan

Arteriosklerosis adalah suatu penyakit yang ditandai dengan penebalan dan hilangnya elastisitas dinding arteri. Bentuk arteriosklerosis yang paling umum ditemukan adalah aterosklerosis yang menyerang arteri besar dan sedang, antara lain pembuluh koroner, pembuluh serebral, dan aorta [1]. Kondisi hiperlipoproteinemia/hiperlipidemia terutama peningkatan kolesterol dan LDL plasma menjadi salah satu faktor risiko terbentuknya lesi aterosklerosis [2]. Aterosklerosis menjadi penyebab infark miokardium (serangan jantung), infark serebri (stroke), aneurisma aorta, dan penyakit vaskular perifer [3].

Data statistik WHO [4] menyebutkan bahwa peringkat pertama dan kedua dalam 10 penyebab kematian terbesar di dunia pada tahun 2012 adalah penyakit jantung (*ischemic heart disease*) sebesar 7,4 juta dan penyakit stroke sebesar 6,7 juta. PJK merupakan penyebab utama dari seluruh kematian di Indonesia, yakni sebesar 26,4% dan didukung hasil riset kesehatan dasar tahun 2013 yang menunjukkan prevalensi penyakit jantung koroner pada umur ≥ 15 tahun di Indonesia sebesar 1,5% [5]. Diperkirakan pada tahun 2020, PJK menjadi pembunuh pertama tersering yakni sebesar 36% dari seluruh kematian di dunia [6].

Tingginya prevalensi penyakit tersebut dapat diakibatkan oleh perubahan gaya hidup masyarakat yang mulai jarang berolahraga dan cenderung memilih mengonsumsi makanan tinggi lemak dan minuman dengan pemanis berupa fruktosa. Kandungan asam lemak jenuh dan asam lemak trans dalam makanan tinggi lemak tersebut dapat meningkatkan kadar kolesterol LDL dan menurunkan kadar kolesterol HDL sehingga risiko aterosklerosis meningkat [7]. Selain itu, diet tinggi lemak juga dapat menimbulkan stres oksidatif endotel pembuluh darah sehingga terbentuk sel busa sebagai lesi awal aterosklerosis [8]. Selain makanan kaya lemak, masyarakat juga mulai senang mengonsumsi minuman ringan yang mengandung fruktosa sebagai pemanis. Padahal diet tinggi fruktosa (>25% kebutuhan energi per hari) akan meningkatkan prevalensi terjadinya sindrom metabolik seperti dislipidemia, obesitas, hipertensi, hiperurisemia, dan resistensi insulin [9]. Fruktosa sangat efisien menginduksi *de novo* lipogenesis (DNL) pada sintesis trigliserida dan VLDL sehingga meningkatkan penimbunan lemak dalam hepar yang menyebabkan penurunan sensitivitas insulin [9]. Pemberian diet tinggi fruktosa juga dapat meningkatkan kadar homosistein sehingga memicu terjadinya aterosklerosis [10].

Kayu kuning (*Arcangelisia flava*) adalah salah satu flora langka Indonesia yang memiliki potensi sebagai agen antiaterosklerosis dikarenakan adanya kandungan alkaloid, flavonoid, saponin, dan terpenoid [10].

Flavonoid bersifat antiaterogenik karena merupakan senyawa antioksidan yang dapat menghambat oksidasi LDL sehingga keutuhan endotel pembuluh darah terjaga dan mengurangi risiko terjadinya aterosklerosis [11]. Ekstrak metanol *A. flava* memiliki aktivitas antioksidan akibat adanya kandungan alkaloid berberin, palmatin, dan jatrorrhizin didalamnya. Aktivitas antioksidan ini ditunjukkan ekstrak metanol *A. flava* dengan EC₅₀ sebesar 25,7 $\mu\text{g/mL}$ [12]. Senyawa berberin selain bersifat antioksidan juga dapat menurunkan sintesis lipid dalam tubuh, mencegah inflamasi dengan menurunkan produksi prostaglandin dan COX-2, dan menghambat proliferasi sel otot polos vaskular [12]. Tumbuhan *A. flava* juga berpotensi sebagai antiaterosklerosis dengan adanya kandungan terpenoid. Terdapat 43 jenis turunan terpenoid yang dapat menghambat sinyal NF- κ B sehingga tidak terjadi proses inflamasi pada endotel pembuluh darah [13].

Berdasarkan pemaparan tersebut maka dilakukan penelitian mengenai aktivitas antiaterosklerosis ekstrak metanol daun *A. flava in vivo* dengan cara pengamatan histopatologi aorta tikus yang diinduksi fruktosa dan diet tinggi lemak.

Metode Penelitian

Penelitian dilakukan pada tahun 2015 di Laboratorium Biomedik dan Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Jember. Jenis penelitian ini adalah penelitian *True Experimental Laboratories* dan terbagi atas 3 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan dosis yang masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus.

Alat dan bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun Kayu kuning (*Arcangelisia flava* (L.) Merr) yang diperoleh dari kawasan konservasi Taman Nasional Meru Betiri desa Andongrejo Kabupaten Jember dan telah diidentifikasi di LIPI UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi, n-heksana, metanol, standar berberin, CMC Na, tablet simvastatin 10 mg (PT. Pertiwi Agung Landson), fruktosa 55%, pakan tinggi lemak, reagen uji LDL, reagen uji HDL, kloroform, *neutral buffer formalin* (NBF) 10%, paraffin, xylol, alkohol berbagai konsentrasi, pewarna *Masson Trichrome*.

Alat yang digunakan adalah mikroskop (Olympus Tipe BX53T), rotary evaporator (Heidolph Laborata 4000), mikrotom, timbangan digital, *glassware*, maserator, peralatan bedah, bioanalizer (*Biolyzer 100™*), densitometer Camag, dan sonde lambung.

Hewan coba

Tikus yang digunakan adalah tikus jantan galur Wistar dengan berat 150-200 gram, umur 2-3 bulan, kadar lipid awal tidak lebih tinggi dari kadar lipid kelompok kontrol normal.

Pembuatan ekstrak metanol daun *A. flava*

Pembuatan ekstrak metanol daun *A. flava* (EMDAf) dengan cara remaserasi. Dipilih daun *A. flava* yang berwarna hijau tua dengan panjang daun lebih dari 5 cm. Cacahan daun diangin-anginkan dan dikeringkan dengan oven suhu 50°C selama 2x24 jam kemudian digiling hingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia ditimbang, dimaserasi sebanyak dua kali (masing-masing selama 48 jam) dengan n-heksana (perbandingan 1:6) dan disaring untuk memisahkan filtrat dengan ampasnya. Ampas dikeringkan kemudian dimaserasi sebanyak tiga kali (masing-masing 24 jam) dengan pelarut metanol (perbandingan 1:6). Maserat disaring dengan bantuan corong *buchner*. Filtrat ditampung dan dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak metanol kental daun *A. flava*.

Penetapan kadar berberin dalam ekstrak

Penetapan kadar berberin dalam ekstrak dilakukan dengan metode KLT-densitometri [14] menggunakan fase diam lempeng silica gel F₂₅₄ dan fase gerak berupa campuran antara toluen, etanol, dan NH₄OH 25% (3:4:1). Sebanyak 10mg berberin dilarutkan dalam 10ml metanol hingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/ml kemudian diencerkan hingga diperoleh konsentrasi 100, 200, 250, dan 500 µg/ml. Selanjutnya ditimbang 75 mg ekstrak metanol daun *A. flava* sebanyak dua kali penimbangan, masing-masing dilarutkan dalam 1 ml metanol. Larutan standar ditotolkan pada lempeng masing-masing sebanyak 2 µl sedangkan larutan ekstrak ditotolkan sebanyak 4 µl dan 8 µl, diekspansi pada fase gerak, dan dianalisis menggunakan densitometer.

Uji kualitatif senyawa flavonoid

Sebanyak 75mg ekstrak metanol daun *A. flava* dilarutkan dalam 1 ml metanol dan ditotolkan pada fase diam sebanyak 6 µl. Analisis dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis menggunakan:

Fase diam : lempeng Silica Gel F₂₅₄

Fase gerak : toluen, etanol, dan NH₄OH 25% (3:4:1)

Penampak noda : sitrat borat

Hasil : positif, jika terdapat warna kuning kehijauan

Pembuatan suspensi ekstrak metanol daun *A. flava*

Ditimbang 500 mg, 1000 mg, dan 1500 mg ekstrak kental daun *A. flava*, masing-masing disuspensikan ke dalam 20 ml CMC Na 1% sehingga didapatkan dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kg BB.

Pembuatan suspensi simvastatin

Sebanyak 18 mg simvastatin disuspensikan ke dalam 100 ml larutan CMC Na 1%. Suspensi simvastatin diberikan pada dosis 1,8 mg/kg BB per hari.

Perlakuan terhadap hewan coba

Sebanyak 24 ekor hewan coba diadaptasikan dalam kandang individual dengan diberi pakan standar dan air minum *ad libitum* selama 1 minggu. Selanjutnya hewan coba ditimbang, diberi tanda pengenalan, dan dicek kadar lipid sebelum induksi.

Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak menjadi 6 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus. Lima kelompok diinduksi hiperlipidemia dengan pemberian 15 gram pakan tinggi lemak (campuran pakan BR2, mentega, dan kuning telur puyuh perbandingan 80:15:5) dan 30 ml air minum fruktosa 27,5% per ekor tikus per hari. Sedangkan satu kelompok sebagai kontrol normal diberi pakan dan minum standar. Induksi hiperlipidemia dilakukan selama 45 hari. Pada hari ke 46 dilakukan pengujian kadar LDL dan HDL tikus. Selanjutnya diberikan perlakuan berupa pemberian suspensi simvastatin (kontrol positif), CMC Na 1% (kontrol negatif), suspensi ekstrak metanol daun *A. flava* dosis 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, dan 750 mg/kg BB melalui sonde oral selama 7 hari. Pada hari ke-8 dilakukan pemeriksaan kembali kadar LDL dan HDL tikus. Setelah itu tikus dibedah untuk pengambilan arcus aorta. Organ disimpan dalam larutan BNF 10% dan dibuat preparat histologi dengan pewarnaan *Masson Trichrome*. Preparat histopatologi aorta diamati dan dihitung jumlah sel busa di tunika intima dan tunika media per irisan melintang. Jumlah sel busa seluruh tikus tiap kelompok perlakuan dijumlah dan dihitung rata-rata.

Perhitungan indeks aterogenik (IA)

Nilai indeks aterogenik dihitung berdasarkan pemeriksaan kadar LDL dan HDL tikus sesuai dengan rumus berikut.

$$\text{Indeks aterogenik} = \frac{\text{kadar LDL (mg/dl)}}{\text{kadar HDL (mg/dl)}}$$

Analisis data

Untuk menguji perbedaan indeks aterogenik masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji ANOVA satu arah. Sedangkan jumlah sel busa diuji dengan metode *Kruskall-Wallis*, bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*. Hasil analisis dikatakan signifikan jika $p < 0.05$ pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0.05$).

Hasil Penelitian

Ekstraksi dan skrining fitokimia ekstrak metanol daun *A. flava*

Ekstraksi daun *A. flava* dengan metode remaserasi menggunakan metanol menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 9,6%. Hasil analisis KLT densitometri menunjukkan kandungan berberin sebesar 0,046% atau 0,46 mg berberin tiap 1 gram ekstrak metanol *A. flava*. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan noda berwarna kuning kehijauan pada lempeng KLT setelah disemprot dengan penampak noda sitrat borat.

Perhitungan indeks aterogenik

Indeks aterogenik merupakan rasio antara kadar LDL dengan kadar HDL. Nilai indeks aterogenik diukur sebelum dan sesudah perlakuan larutan uji kemudian dihitung persen penurunan terhadap nilai indeks aterogenik awal (Tabel 1.) untuk mengetahui pengaruh ekstrak terhadap penurunan nilai indeks aterogenik.

Tabel 1. Hasil perhitungan nilai indeks aterogenik (IA)

Perlakuan	Pretest	Posttest	Penurunan IA (%)
Kontrol (+)	4,16 ± 2,03	2,80 ± 1,09	30,50 ± 18,21 ^c
Kontrol (-)	2,31 ± 0,67	3,96 ± 1,76	- 85,42 ± 102,56 ^{ab}
Normal	1,22 ± 0,23	1,14 ± 0,19	3,19 ± 24,02 ^a
Dosis 250 mg/kgBB	2,80 ± 0,8	2,11 ± 0,40	20,86 ± 12,44 ^d
Dosis 500 mg/kgBB	1,79 ± 0,27	2,34 ± 0,94	- 28,60 ± 46,82 ^b
Dosis 750 mg/kgBB	2,09 ± 0,45	2,06 ± 0,47	14,00 ± 4,77 ^e

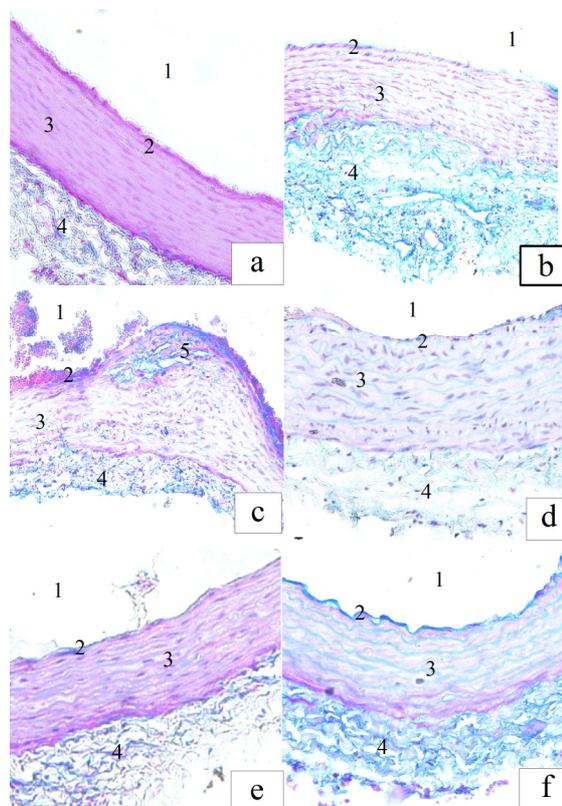
^adata disajikan sebagai rerata ± SD (n=4), huruf yang sama menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0.05$). nilai negatif menunjukkan kenaikan nilai indeks aterogenik.

Berdasarkan nilai penurunan indeks aterogenik dapat diketahui bahwa dosis 250 mg/kg BB dan 750 mg/kg BB dapat menurunkan

nilai indeks aterogenik berturut-turut sebesar 20,86% dan 14 % walaupun belum sebesar kontrol positif (30,5%). Namun hasil analisis statistik menggunakan ANOVA satu arah belum menunjukkan perbedaan yang bermakna diantara keenam kelompok tersebut ($p > 0.05$). Pemberian diet tinggi lemak dan fruktosa 27,5% terbukti dapat meningkatkan nilai indeks aterogenik pada kontrol negatif dari 2,31 menjadi 3,96.

Gambaran histopatologi aorta

Gambaran mikroskopis potongan melintang arcus aorta tikus setelah induksi hiperlipidemia dan diberi perlakuan dapat dilihat pada Gambar 1.

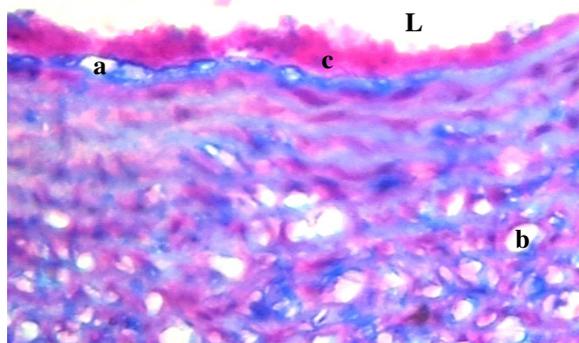


Gambar 1. Gambaran mikroskopis aorta potongan melintang setelah induksi hiperlipidemia dan 7 hari perlakuan dengan pewarnaan MT (perbesaran 200x); a. Kontrol normal; b. Kontrol positif (simvastatin 1,8 mg/kg BB); c. Kontrol negatif (CMC Na 1%); d. EMDAf 250 mg/kg BB; e. EMDAf 500 mg/kg BB; f. EMDAf 750 mg/kg BB; 1. lumen arteri; 2. tunika intima; 3. tunika media; 4. tunika adventisia; 5. fibrous cap.

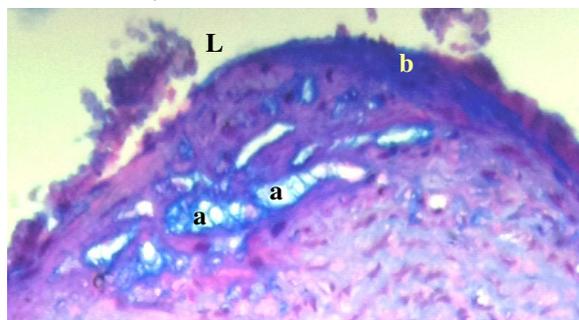
Seperti yang terlihat pada Gambar 1a, potongan aorta kontrol normal sel-sel pada tunika intima dan media tersusun rapi, tidak nampak adanya penebalan tunika, sel busa, maupun perdarahan pada lumen arteri. Pada Gambar 1b, kelompok kontrol positif tidak menunjukkan adanya penebalan tunika, sel-sel pada tunika media tersusun rapi mendekati

kondisi normal namun ada beberapa bagian tunika intima yang tidak utuh dan adanya sel busa dalam jumlah kecil. Sedangkan pada kontrol negatif (Gambar 1c), tampak penebalan tunika media dan tunika intima akibat adanya sel busa, perdarahan pada lumen arteri, dan fibrosis (*fibrous cap*) yang terlihat seperti tonjolan ke arah lumen arteri. Adanya *fibrous cap*, perdarahan, dan sel busa terlihat lebih jelas dengan perbesaran 400x seperti ditunjukkan pada Gambar 2 dan Gambar 3.

Gambar 1d menunjukkan gambaran histopatologi aorta kelompok dosis 250 mg/kg BB. Pada kelompok tersebut terlihat masih adanya penebalan tunika di beberapa bagian, adanya sel busa, sel-sel di tunika media tidak beraturan dan ada sedikit perdarahan di tunika intima. Gambaran mikroskopis aorta kelompok dosis 500 mg/kg BB (Gambar 1e) tidak menunjukkan adanya penebalan tunika media namun masih terlihat beberapa sel busa. Sedangkan pada kelompok dosis 750 mg/kg BB sudah tidak terlihat adanya sel busa maupun penebalan tunika, sel-sel pada tunika media tersusun rapi mendekati kondisi normal.



Gambar 2. Gambar mikroskopik aorta kelompok kontrol negatif; L. Lumen arteri; a.sel busa pada tunika intima; b. sel busa pada tunika media; c.perdarahan pada lumen sehingga tunika intima dan tunika media tampak menebal, perbesaran 400x .



Gambar 3. *Fibrous cap* pada kelompok kontrol negatif; a. Sel busa; b. Fibrosis; L. Lumen arteri Perbesaran 400x.

Perhitungan jumlah sel busa

Sel busa di tunika intima dan tunika media pada setiap potongan melintang aorta tikus per kelompok perlakuan dijumlah dan dirata-rata (Tabel 2). Berdasarkan Tabel 2 dapat diketahui bahwa jumlah sel busa pada kelompok EMDAf dosis 250, 500, dan 750 mg/kg BB lebih sedikit dibanding kontrol negatif. Jumlah sel busa pada kelompok dosis 750 mg/kg BB lebih kecil dibandingkan kontrol positif.

Tabel 2. Perhitungan jumlah sel busa

Perlakuan	Jumlah sel busa
Kontrol normal	0 ± 0 ^a
Kontrol positif	3,25 ± 1,50 ^{b,c}
Kontrol negatif	52 ± 38,51 ^e
Dosis 250 mg/kg BB	6 ± 3,74 ^{b,c,d}
Dosis 500 mg/kg BB	5 ± 4,08 ^d
Dosis 750 mg/kg BB	0 ± 0 ^a

^{a)}data disajikan sebagai rerata ± SD (n=4), huruf yang sama menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan dengan uji *Mann Whitney U* (p>0.05).

Hasil uji *Kruskall-Wallis* memperlihatkan bahwa terdapat perbedaan jumlah sel busa secara bermakna pada masing-masing kelompok perlakuan (p<0.05). Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna maka dilakukan uji *Mann Whitney*. Berdasarkan hasil uji *Mann Whitney* diperoleh hasil bahwa ketiga kelompok dosis EMDAf memiliki perbedaan jumlah sel busa yang bermakna dengan kontrol negatif (p>0.05). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian EMDAf pada berbagai dosis telah dapat menurunkan jumlah sel busa. Dosis 750 mg/kg BB menunjukkan jumlah sel busa yang lebih sedikit dan berbeda bermakna dibandingkan kontrol positif (p<0.05) dan tidak berbeda signifikan jika dibandingkan kontrol normal (p>0.05).

Pembahasan

Penelitian ini menggunakan hewan coba berupa tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan karena anatomi dan fisiologi dari organ hewan tersebut hampir sama dengan fungsi anatomi organ manusia dan jenis kelamin jantan untuk menghindari pengaruh hormon estrogen yang dapat mempengaruhi sintesis lemak dan kolesterol [15].

Induksi hiperlipidemia pada hewan coba menggunakan fruktosa 27,5% melalui air minum dan pakan tinggi lemak terbukti dapat meningkatkan nilai indeks aterogenik dan jumlah sel busa. Hal ini dikarenakan fruktosa sangat efisien menginduksi *de novo*

lipogenesis [9] sehingga pemaparan fruktosa pada liver dalam jumlah besar menstimulasi lipogenesis secara cepat [16]. Fruktosa dimetabolisme menjadi trigliserida dan LDL [9]. Pemberian fruktosa 10% pada tikus selama 8 minggu menunjukkan adanya peningkatan kadar kolesterol total, trigliserida, dan nitrit oksid sebagai indikator stress oksidatif [17]. Peristiwa ini terjadi karena fruktosa menginduksi SREBP-1 dan ekspresi gen lipogenik seperti *fatty acid sintase* (FAS), *acetyl-CoA carboxylase* (ACC), dan *stearoyl-CoA desaturase* (SCD). SREBP-1 merupakan faktor transkripsi yang meregulasi biosintesis asam lemak dan kolesterol. SREBP-1 berikatan dengan *sterol responsive elements* (SRE) dan mengaktifkan serangkaian enzim yang terlibat dalam biosintesis kolesterol seperti HMG-CoA reduktase dan *fatty acid sintase* [9].

Gambaran mikroskopik aorta tikus yang diinduksi pakan tinggi lemak menunjukkan adanya sel busa di tunika intima dan tunika media. Hal ini diakibatkan kandungan asam lemak jenuh dan asam lemak trans dalam mentega dan kuning telur puyuh pada pakan tinggi lemak. Kuning telur puyuh memiliki kadar kolesterol paling tinggi dibanding kuning telur ayam dan itik, yaitu 2139,17 mg per 100 gram bahan. Tikus yang diberi diet kuning telur puyuh selama 8 minggu menunjukkan rasio kolesterol/HDL yang paling tinggi dibandingkan tikus yang diberi kuning telur lain (ayam ras, ayam kampung, itik) [18]. Mentega mengandung asam lemak jenuh sebesar 53% per takaran saji [19], 300 mg kolesterol per 100 gram bahan, dan lemak trans [20]. Asam lemak jenuh dapat meningkatkan kadar LDL sedangkan asam lemak trans dapat meningkatkan kadar LDL dan menurunkan kadar HDL bersamaan [7]. Asupan makanan tinggi kolesterol dan lemak jenuh tersebut menyebabkan terjadinya hiperlipidemia yang dapat mengganggu fungsi endotel melalui peningkatan pembentukan radikal bebas oksigen yang mendeaktivasi nitrat oksida. Radikal bebas akan menghasilkan LDL teroksidasi (LDL-oks) yang kemudian ditangkap oleh makrofag melalui *scavenger receptor* secara terus menerus sehingga makrofag berubah menjadi sel busa. Radikal bebas juga memicu migrasi sel otot polos dari tunika media ke dalam tunika intima, proliferasi sel-sel otot polos di tunika intima, fibroblas dan sekresi kolagen oleh fibroblas. Sel busa ini kemudian bersatu membentuk *fatty streak* (bercak perlemakan) sebagai prekursor aterosklerosis [8]. Kombinasi antara pemberian fruktosa dosis 1,8 g/kg BB dengan pakan tinggi lemak selama 50 hari dapat menimbulkan plak-plak lemak pada aorta tikus [21].

Rasio LDL/HDL adalah perhitungan untuk indeks aterogenik. Peningkatan rasio LDL/HDL

merupakan parameter yang paling prediktif untuk insiden aterosklerosis dan PJK, dibanding hanya kadar kolesterol total yang tinggi maupun kolesterol LDL sendiri. Peningkatan *low density lipoprotein* (LDL) dalam darah dapat menyebabkan aterosklerosis, sedangkan kadar *high density lipoprotein* (HDL) yang tinggi memberikan efek protektif. Pada tikus, nilai normal untuk indeks aterogenik berkisar antara 0,34-0,35 [15]. Pemberian ekstrak metanol daun *A. flava* dosis 250 dan 750 mg/kg BB terbukti dapat menurunkan rasio LDL/HDL meskipun tidak signifikan dan tidak sebesar penurunan pada kontrol positif (Tabel 1). Walaupun mengalami penurunan nilai indeks aterogenik namun nilai indeks aterogenik seluruh kelompok setelah 7 hari perlakuan masih diatas rentang normal sehingga risiko aterosklerosis masih dapat terjadi.

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 [22]. 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. Hasil analisis *Mann Whitney* menunjukkan peningkatan dosis ekstrak metanol daun *A. flava* yang diberikan sebanding dengan penurunan jumlah sel busa dan berbeda bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif ($p < 0.05$).

Pengaruh pada penurunan indeks aterogenik (rasio LDL/HDL) dan jumlah sel busa serta perbaikan gambaran histopatologi aorta tikus ini diakibatkan adanya kandungan berberin dan flavonoid dalam ekstrak metanol daun *A. flava*. Metanol dipilih sebagai pelarut ekstraksi karena dapat menyari kedua zat tersebut berdasarkan sifat kepolarannya [23].

Berberin mampu menurunkan konsentrasi LDL dengan meningkatkan aktivitas transkripsional promoter reseptor LDL melalui jalur JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) dan menstabilisasi reseptor LDL melalui jalur sinyal *extracellular-regulated kinase* (ERK)-dependent. Pengaruh pada 5' AMPK dan pengeblokan jalur MAPK/ERK menyebabkan inhibisi sintesis lipid pada sel hepatosit [12]. Berberin yang diberikan selama 16 minggu mampu melawan hiperhomosisteinemia dan hiperlipidemia melalui peningkatan level reseptor LDL dan apoE mRNA serta menekan ekspresi gen HMGR (*3-hydroxy-3-methyl-*

glutaryl-CoA reductase) pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak [24]. Selain itu, berberin memiliki efek proteksi terhadap oksidasi LDL dan sitotoksitas pada sel endotel akibat oksidasi LDL. Berberin juga memperlihatkan 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. Efek antiinflamasi endotelium pembuluh darah ditunjukkan dengan mekanisme penurunan produksi prostaglandin dan jumlah protein COX-2 [12].

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 risiko terjadinya aterosklerosis [11].

Pemilihan dosis 250, 500, dan 750 mg/kg BB didasarkan pada penelitian yang menyatakan bahwa ekstrak kloroform daun *A. flava* pada dosis 250 dan 500 mg/kg BB memiliki efek antikardiotoksitas pada terapi doksorubisin akibat adanya aktivitas antioksidan didalam ekstrak [14]. Aktivitas antioksidan juga diperlukan dalam pengobatan aterosklerosis karena salah satu pemicu aterosklerosis adalah radikal bebas yang menyebabkan disfungsi endotel dan perubahan LDL menjadi LDL-oks yang kemudian berkembang menjadi lesi aterosklerosis [3].

Simvastatin dipilih sebagai kontrol positif karena merupakan monoterapi poten untuk menurunkan kadar kolesterol total dan LDL [25], dan dapat menurunkan kejadian komplikasi kardiovaskular serius sekitar 30% pada penderita penyakit vaskular aterosklerosis. Statin mencegah kejadian aterotrombosis, memperbaiki fungsi vasomotor endotelium, meningkatkan aktivitas fibrinolisis sel endotelium, menurunkan potensi trombogenesis, dan menghambat aktivasi platelet melalui mekanisme nonkolesterol [26]. Pemilihan dosis didasarkan pada dosis awal terapi pencegahan penyakit kardiovaskuler pada manusia yaitu 20 mg [27] yang disetarakan menjadi 1,8 mg/kg BB pada tikus.

Simpulan dan Saran

Dari hasil penelitian yang diperoleh maka dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak metanol daun *A. flava* memiliki pengaruh terhadap penurunan indeks aterogenik dan perbaikan gambaran histopatologi aorta tikus hiperlipidemia berdasarkan jumlah sel busa. Indeks aterogenik mengalami penurunan sebesar 20,86% dan 14% pada dosis 250 mg/kg

BB dan 500 mg/kg BB. Kenaikan dosis yang diberikan dari 250 mg/kg BB, 500 mg/kg BB, hingga 750 mg/kg BB menunjukkan penurunan jumlah sel busa dibandingkan dengan kontrol negatif.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai toksisitas ekstrak metanol daun *A. flava*, metode induksi hiperlipidemia yang lebih efektif, optimasi lama waktu dan besar dosis pemberian ekstrak pada hewan coba untuk mendapatkan penurunan indeks aterogenik dan perbaikan gambaran histologi aorta yang lebih optimal, dan perlunya budidaya tanaman *A. flava* agar pemanfaatannya sebagai obat maupun bahan penelitian tidak mengancam kepunahannya.

Daftar Pustaka

- [1] Suyatna FD. Hipolipidemik dalam farmakologi dan terapi edisi 5. Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FK UI; 2007.
- [2] Ross R, Harker L. Hyperlipidemia and atherosclerosis: chronic hyperlipidemia initiates and maintains lesions by endothelial cell desquamation and lipid accumulation. *Science*. 1976; 193(4258): 1094-1100.
- [3] Schoen FJ, Cotran RS. Pembuluh darah dalam buku ajar patologi Robbins volume 2. Jakarta: EGC; 2007.
- [4] WHO. The top 10 causes of death: the 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. 2014. [2015 Januari 13] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [5] Kemenkes RI. Riset kesehatan dasar 2013. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI; 2013.
- [6] Ditjen Binfar. Pharmaceutical care untuk pasien penyakit jantung koroner: fokus sindrom koroner akut. Jakarta: Direktorat Bina Farmasi Klinik dan Komunitas; 2006.
- [7] Tuminah S. Efek asam lemak jenuh dan asam lemak tak jenuh "trans" terhadap kesehatan. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*. 2009; 29(2): 13-20.
- [8] Maramis R, Kaseke M, Tanudjadja M. Gambaran histologi aorta tikus Wistar dengan diet lemak babi setelah pemberian ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L). *Jurnal e-Biomedik*. 2014; 2(2): 430-435.
- [9] Prahastuti S. Konsumsi fruktosa berlebihan dapat berdampak buruk bagi

- kesehatan manusia. JKM. 2011; 10(2): 173-189.
- [10] Maryani, Marsoedi, Nursyam, Maftuch. The phytochemistry and the anti-bacterial activity of yellow root (*Arcangelisia flava* Merr.) against *Aeromonas hydrophila*. JBLS. 2013; 4(2): 180-190.
- [11] Nijveldt, Nood, Hoorn, Boelens, Norren, Leeuwen. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. Am J Clin Nutr. 2011; 74: 418–25.
- [12] Wu Min, Wang Jie, Liu Long-tao. Advance of studies on anti-atherosclerosis mechanism of berberine. Chin J Integr Med. 2010; 16(2): 188-192.
- [13] Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kb signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. Cell.Mol.Life Sci. 2008; 65: 2979 – 2999.
- [14] Baroroh RK. Pengaruh ekstrak kloroform akar kuning (*Arcangelisia flava* Merr.) terhadap sistem imun tikus jantan putih galur Wistar yang dipejani doxorubicin. Skripsi. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember; 2014.
- [15] Paulina AJ, Asni E, Gaffar AM. Pengaruh lama pemberian diet aterogenik terhadap indeks aterogenik aerum *Rattus novergicus* strain Wistar jantan. Jom FK. 2015; 2(2).
- [16] Basciano H, Federico L, Adeli K. Review: Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. Nutrition & Metabolism. 2005; 2(5).
- [17] Abo-youssef AM, Mohammed R. Effects of *Brassica rapa* on fructose-induced metabolic syndrome in rats: a comparative study. Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2013; 21(1); 1-5.
- [18] Dwiloka B. Efek kolesterolemik berbagai telur. Media Gizi dan Keluarga. 2003; 27(2): 58-65.
- [19] Rosenthal MS. Revolusi terapi hormon: pendekatan alami. Yogyakarta: B-First; 2009.
- [20] Silalahi J, Tampubolon SDR. Asam lemak trans dalam makanan dan pengaruhnya terhadap kesehatan. JTIP. 2002; 13(2): 184-188.
- [21] Warditiani NK, Nugroho AE. Uji aktivitas antihiperlipidemia dan antiaterosklerosis isolat andrografolid dan ekstrak terpurifikasi herba sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f) Ness) pada tikus diabetes tipe 2 resisten insulin. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada; 2012.
- [22] Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology 10th ed. San Fransisco : Mc Graw Hill; 2006.
- [23] Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: a review. IPS. 2011; 1(1).
- [24] Chang, Yan, Xu, Xia, Bian, Zhu, Gao. The effects of berberine on hyperhomocysteinemia and hyperlipidemia In rats fed with a long-term high-fat diet. Lipids Health Dis. 2012;11(86).
- [25] Dipiro, Talbert, Yee, Matzke, Wells, Posey. Pharmacotherapy a pathophysiologic approach. New York: Mc Graw Hill; 2008.
- [26] Syamsudin. Buku ajar farmakoterapi kardiovaskular dan renal. Jakarta: Penerbit Salemba Medika; 2011.
- [27] BNF. British National Formulary 58. London: Pharmaceutical Press; 2009.