

UJI AKTIVITAS ANTIKOLESTEROL KOMBINASI EKSTRAK DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina*) DAN DAUN PINUS (*Pinus merkusii*) SECARA IN VITRO

Bella Vania Sianto¹, Rollando², Sabrina Handayani Tambun³

Unviuersitas Ma Chung, Universitas Ma Chung, Universitas Ma Chung

Email Korespondensi : 611710015@student.machung.ac.id, ro.llando@machung.ac.id, sabrina.handayani@dlb.machung.ac.id

Abstrak

Dislipidemia merupakan abnormalitas kadar lipid dan lipoprotein dalam plasma dan merupakan salah satu penyebab timbulnya berbagai penyakit kardiovaskular seperti arterosklerosis dan jantung koroner. Pencegahan dislipidemia dapat dilakukan dengan tumbuhan obat herbal yang mengandung senyawa fitokimia penurun kolesterol. Salah satu tanaman obat yang banyak dijumpai di Indonesia adalah daun afrika dan pohon pinus. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak dari tanaman tersebut bermanfaat dalam menurunkan kadar kolesterol. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai kandungan dan aktivitas ekstrak daun afrika dan daun pinus dalam menghambat kolesterol.

Pada penelitian ini, uji aktivitas antikolesterol dilakukan secara in vitro dengan metode Liebermann Burchard. Penelitian diawali dengan pengumpulan dan identifikasi bahan berupa daun afrika dan daun pinus. Daun kemudian dikeringkan dan dihaluskan sehingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk simplisia kemudian diekstraksi melalui proses maserasi atau perendaman dalam pelarut etanol sehingga diperoleh ekstrak daun afrika dan daun pinus. Ekstrak kemudian diidentifikasi kandungan senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas antikolesterol, seperti flavonoid, tanin, saponin, fenolik, dan steroid. Ekstrak tersebut kemudian diuji aktivitas antikolesterolnya menggunakan spektrofotometri UV-Vis

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa dalam sampel ekstrak daun afrika mengandung senyawa fenolik, tanin, saponin, dan steroid sedangkan dalam sampel ekstrak daun pinus mengandung senyawa flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan steroid. Hasil uji antikolesterol dengan metode Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa ekstrak daun afrika dan daun pinus dapat menurunkan kadar kolesterol secara in vitro dengan daya hambat EC50 sebesar 4671,91 ppm. Untuk penelitian selanjutnya disarankan agar pada proses ekstraksi digunakan jenis pelarut dan metode yang berbeda, dilakukan isolasi bahan aktif, dan dilakukan uji antikolesterol secara in vivo.

Kata kunci: *Vernonia amygdalina*, *Pinus merkusii*, antikolesterol, Liebermann-Burchard

Abstract

Dyslipidemia is an abnormality of lipid and lipoprotein levels and is one of the causes of cardiovascular diseases. Prevention of dyslipidemia can be done with herbal medicinal plants containing cholesterol-lowering phytochemical compounds. Some medicinal plants that are often found in Indonesia are bitter leaf and pine tree. Research has shown that extracts from these plants has cholesterol lowering effects. Therefore, a study was conducted on the content and activity of bitter leaves and pine leaves extract in inhibiting cholesterol.

In this study, the in vitro anticholesterol test was

carried out using the Liebermann Burchard method. The study began with the collection of bitter leaves and pine leaves. The leaves are then dried and crushed into simplicia powder. The simplicia powder was then extracted through maceration and immersion in ethanol solvent to obtain bitter leaf and pine leaf extracts. The phytochemical compounds such as flavonoids, tannins, saponins, phenolics, and steroids in the extract is then identified. The extract was tested for its anticholesterol activity using UV-Vis spectrophotometry

The results of phytochemical screening showed that the bitter leaf extract contained phenolic compounds, tannins, saponins, and steroids, while the pine leaf extract contained flavonoids, phenolic compounds, tannins, saponins, and steroids. The results of the anticholesterol test using the Liebermann-Burchard method showed that the extract could reduce cholesterol levels with EC50 of 4671.91 ppm. For further research, it is recommended that the extraction process use different types of solvents and methods, isolate the active ingredients, and perform an in vivo anticholesterol test.

Keywords: Vernonia amygdalina, Pinus merkusii, anticholesterol, Liebermann-Burchard

1 Pendahuluan

Dislipidemia merupakan abnormalitas kadar lipid atau lipoprotein yang umumnya ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total, kolesterol LDL, kadar trigliserida, dan penurunan kadar kolesterol HDL yang dapat disebabkan oleh adanya gangguan pada proses metabolisme atau transportasi lipid dalam sirkulasi darah (Ahmed, 2020; Erwianto et al., 2017). Saat ini, maraknya pola makan serta gaya hidup yang tidak sehat berperan dalam peningkatan prevalensi dislipidemia pada masyarakat, hal tersebut menyebabkan dislipidemia menjadi permasalahan yang serius dalam dunia kesehatan (Ahmed, 2020). Dislipidemia dapat menyebabkan berbagai permasalahan klinis seperti penyakit kardiovaskular yang menjadi salah satu penyebab utama kematian dan peningkatan kasus morbiditas dan mortalitas di berbagai negara termasuk Indonesia (Sudiada dan Lestari, 2015). Hal tersebut disebabkan karena peningkatan kadar kolesterol dapat menyebabkan penebalan dinding dan penyempitan pembuluh darah yang dapat kemudian menyebabkan jantung koroner dan arterosklerosis (Erwianto et al., 2017; Gau and Wright, 2006).

Manajemen dislipidemia umumnya dilakukan dengan tujuan mengontrol profil lipid dimana pada pencegahan penyakit jantung, penurunan kadar kolesterol



LDL (*Low Density Lipoprotein*) telah menjadi target utama intervensi lipid. Terapi dislipidemia dapat dilaksanakan secara farmakologis atau non farmakologis melalui perubahan gaya hidup dan penggunaan obat-obatan konvensional penurun kolesterol seperti golongan statin (HMG-CoA reduktase) (Erwanto dkk., 2017). Saat ini, masyarakat banyak beralih kepada terapi herbal dalam pengobatan penyakit dikarenakan terapi herbal memerlukan biaya yang lebih sedikit dan potensi efek samping serta toksisitas yang dihasilkan lebih rendah sehingga lebih aman dari terapi dengan obat sintetik (Anneke dan Sulistyanyingsih, 2018; Ashfaq et al., 2013). Penelitian menunjukkan kandungan senyawa fitokimia seperti flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan steroid dalam tumbuhan dapat memberikan manfaat terapeutik yang luas, seperti antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik dan antikarsinogenik sehingga dapat dimanfaatkan pada bidang kesehatan dalam pencegahan penyakit (Panche et al., 2016).

Indonesia merupakan negara yang kaya akan sumber daya tanaman obat dan terapi menggunakan tanaman sebagai bahan obat telah banyak dilakukan di Indonesia dalam bentuk jamu dan obat herbal tradisional (Jumiarni dan Komalasari, 2017). Daun afrika (*Vernonia amygdalina*) merupakan tumbuhan semak setinggi 2-5 meter yang banyak tumbuh di Afrika barat yang beriklim tropis dan di berbagai negara Asia, termasuk Indonesia. Ekstrak daun afrika memiliki efek antioksidan sitotoksik antimikroba dan antiparasit yang disebabkan oleh kandungan senyawa aktif alkaloid, saponin, terpen, lignan, dan flavonoid. Pohon pinus (*Pinus merkusii*) merupakan tumbuhan konifer berdaun jarum dengan tinggi 20-30 meter. Pohon pinus banyak tersebar di pegunungan Sumatera utara, seperti Aceh, Tapanuli, dan Kerinci. Daun pinus mengandung senyawa aktif polifenol, terpenoid, flavonoid sehingga memiliki efek antioksidan, antimikroba, antijamur, dan antiinflamasi sehingga dapat dimanfaatkan pada bidang farmasi dan kosmetik (Ramadhani dan Girsang, 2021).

Daun afrika dan pohon pinus merupakan tanaman yang banyak ditemui di Indonesia dan mengandung senyawa yang berkhasiat dalam menurunkan kadar kolesterol. Penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak etanol daun Afrika dapat menurunkan kadar kolesterol total secara signifikan sehingga dapat digunakan untuk menurunkan resiko penyakit kardiovaskular (Ardriani, 2017) sedangkan penelitian mengenai manfaat ekstrak etanol daun pinus dapat menurunkan kadar kolesterol, asam urat, dan kadar glukosa, sehingga dapat memberikan efek hipolipidemia (Moza, 2019). Penelitian sebelumnya menunjukkan ekstrak kedua tanaman tersebut mampu menurunkan kadar kolesterol, tetapi saat ini belum ada penelitian lebih lanjut mengenai kombinasi ekstrak daun afrika dan daun pinus dalam pencegahan dislipidemia dan menurunkan resiko penyakit kardiovaskular. Pada pengobatan tradisional, penggunaan lebih dari satu jenis bahan obat yang berinteraksi secara sinergis dalam satu formula herbal dapat menghasilkan interaksi dan efek terapeutik

yang lebih efektif, sehingga dapat meningkatkan efek farmakologis (Haiyun dkk., 2009). Karena itu, pada penelitian ini, penulis tertarik untuk melaksanakan penelitian mengenai aktivitas dari dua jenis ekstrak tanaman yang berbeda, yaitu daun afrika dan daun pinus, kedua ekstrak herbal tersebut kemudian diteliti efek antikolesterolnya untuk mengetahui apakah kombinasi ekstrak tersebut dapat dimanfaatkan sebagai terapi alternatif untuk dislipidemia secara herbal.

2 Metodologi Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini, alat-alat yang digunakan adalah *waterbath* Memmert WMB 10, pisau *stainless steel*, mortar dan alu, blender kering Philips, neraca analitik Ohaus 3 digit, neraca analitik Ohaus 4 digit, kain saring, kertas saring Whatman, toples kaca, aluminium foil, cawan porselen, corong kaca Iwaki 75mm, tabung reaksi Pyrex, tabung reaksi Iwaki CTE33, pipet tetes kecil, mikropipet, pipet ukur Iwaki CTE33 10 mL, vial kaca, gelas ukur Iwaki CTE33 100 mL, labu ukur Pyrex 100 ml, labu ukur Pyrex 10 ml, labu ukur Pyrex 5 ml, batang pengaduk, spatula, dan seperangkat spektrofotometer UV-Vis JAS.CO V-760. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*), ekstrak daun pohon pinus (*Pinus merkusii*), etanol 70%, etanol 96%, akuades, serbuk kolesterol, serbuk magnesium, asam klorida pekat, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, natrium klorida, gelatin, besi(III)klorida, dan kloroform.

2.2 Prosedur Kerja

2.2.1 Pengumpulan bahan dan identifikasi

Proses pengumpulan tanaman sampel dilakukan pada bulan Maret 2021 pada musim panas. Sampel yang digunakan berupa daun afrika segar (*Vernonia amygdalina*) yang diperoleh dari Kota Medan, Sumatera Utara dan daun pohon pinus (*Pinus merkusii*) yang diperoleh dari Kota Malang, Jawa Timur. Proses identifikasi spesimen dilaksanakan di UPT Materia Medika, Batu, Jawa Timur.

2.2.2 Pembuatan simplisia

Pada pembuatan simplisia, sebanyak 2 kg sampel daun segar dicuci bersih menggunakan air mengalir dari partikel debu, kotoran, dan sisa tanah yang ikut terbawa. Daun yang telah dibersihkan kemudian ditiriskan dan dikeringkan dengan diangin-anginkan di tempat yang terhindar dari cahaya matahari langsung pada suhu ruang atau sekitar 25° C. Daun dibiarkan selama kurang lebih tujuh hari hingga diperoleh sampel daun yang kering sepenuhnya. Daun yang telah dikeringkan kemudian dihancurkan menjadi potongan yang lebih kecil menggunakan mortar dan alu. Daun kemudian dihaluskan menggunakan blender hingga dihasilkan serbuk simplisia halus. Serbuk simplisia kemudian dipindahkan ke dalam wadah bersih tertutup rapat dan disimpan di tempat kering dan terhindar dari cahaya matahari langsung.

2.2.3 Proses ekstraksi

Proses pembuatan ekstrak dilakukan menggunakan metode maserasi. Mula-mula ditimbang sebanyak 500 gram serbuk simplisia yang kemudian dimasukkan ke dalam bejana kaca bertutup. Ke dalam bejana ditambahkan cairan penyari berupa etanol 70% sebanyak 3,75 liter dengan perbandingan 1:7,5 bagian sebagai cairan penyari hingga serbuk simplisia terendam sepenuhnya. Bejana kemudian ditutup rapat dan disimpan di tempat terlindung dari cahaya matahari langsung. Perendaman dilakukan selama 48 jam dan serbuk yang terendam diaduk tiap 6 jam. Setelah 48 jam, larutan disaring menggunakan kain saring dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari residu. Filtrat cair yang telah dipisahkan dari ampas daun kemudian dipekatkan menggunakan *waterbath*. Cairan ekstrak ditempatkan dalam cawan porselen kemudian ditempatkan di atas *waterbath* pada suhu 70° C hingga pelarut menguap seluruhnya atau hingga dihasilkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat kemudian ditempatkan ke dalam botol atau vial steril tertutup dan disimpan dalam desikator (Anggraini dan Kusuma, 2019; Lindawati dan Ningsih, 2020)

2.2.4 Skrining fitokimia ekstrak

Untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun afrika dan daun pinus, maka perlu dilakukan uji fitokimia secara kualitatif untuk mengidentifikasi adanya kandungan senyawa dengan potensi aktivitas antikolesterol, seperti flavonoid, tanin, dan saponin.

2.2.4.1 Identifikasi senyawa flavonoid

Penentuan senyawa flavonoid diawali dengan penyiapan sampel ekstrak yang dilarutkan dalam etanol 95%. Ke dalam larutan kemudian ditambahkan 0,1 g serbuk magnesium dan 10,0 ml HCl pekat. Adanya kandungan flavonoid ditandai dengan timbulnya warna kuning (Lindawati dan Ningsih, 2020; Anggraini dan Ali, 2017), merah lembayung, atau merah muda pada larutan (De Silva, et al., 2017)

2.2.4.2 Identifikasi senyawa tanin

Penentuan senyawa tanin diawali dengan penyiapan sampel ekstrak kemudian ke dalam larutan ditambahkan beberapa tetes larutan gelatin 1% yang dilarutkan dalam natrium klorida. Adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya endapan putih pada larutan (Ifora dan Wijaya, 2018; De Silva, et al., 2017)

2.2.4.3 Identifikasi senyawa saponin

Penentuan senyawa saponin diawali dengan penyiapan sampel ekstrak kemudian ditambahkan 10,0 mL air panas dan didinginkan selama beberapa detik. Tabung reaksi ditutup dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian tabung diletakkan dalam posisi tegak. Adanya kandungan saponin ditandai dengan timbulnya buih pada larutan setinggi 1 hingga 10 cm yang stabil

selama tidak kurang dari 10 menit (Lindawati dan Ningsih, 2020).

2.2.4.4 Identifikasi senyawa fenolik

Penentuan senyawa fenolik diawali dengan penyiapan sampel ekstrak kemudian ditambahkan 1 mL larutan FeCl₃ 1%. Adanya kandungan fenolik ditandai dengan timbulnya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat pada larutan (Ifora dan Wijaya, 2018; Lindawati dan Ningsih, 2020; De Silva, et al., 2017).

2.2.4.5 Identifikasi senyawa steroid

Penentuan senyawa steroid diawali dengan penyiapan sampel ekstrak yang dilarutkan dalam 2 mL kloroform. Ke dalam larutan kemudian ditambahkan beberapa tetes asamasetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Adanya kandungan steroid ditandai dengan timbulnya warna merah muda, merah, atau hijau biru pada larutan (Lindawati dan Ningsih, 2020; De Silva, et al., 2017).

2.2.5 Uji antikolesterol

2.2.5.1 Pembuatan larutan stok kolesterol

Pembuatan larutan baku induk berupa larutan kolesterol dalam kloroform dengan konsentrasi sebesar 1000 ppm diawali dengan ditimbang sebanyak 25 mg serbuk kolesterol yang ditempatkan dalam labu ukur 25 ml. Ke dalam labu ukur tersebut ditambahkan kloroform hingga tanda batas volume 25 ml, labu ukur kemudian dikocok hingga serbuk kolesterol larut sepenuhnya (Sahara et al., 2021).

2.2.5.2 Penentuan panjang gelombang maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan larutan standar kolesterol dengan konsentrasi 100 ppm. Pembuatan larutan standar kolesterol dilakukan dengan dipindahkan sebanyak 0,5 ml larutan baku kolesterol 1000 ppm ke dalam labu ukur 5,0 ml. Ke dalam labu ukur tersebut, larutan diencerkan dengan kloroform hingga tanda batas volume 5 ml dan dikocok kuat-kuat. Larutan standar kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan asamasetat anhidrat sebanyak 2,0 ml dan asam sulfat pekat sebanyak 0,1 ml. Tabung reaksi dilapisi dengan aluminium foil sehingga larutan terhindar dari paparan sinar matahari. Larutan kemudian didiamkan selama 15 menit dan dianalisis panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada rentang 400-700 nm (Amin, 2015; Ilyas et al., 2020; Lindawati dan Ningsih, 2020).

2.2.5.3 Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* kolesterol ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dan larutan standar kolesterol dengan konsentrasi 100 ppm. Pembuatan larutan standar kolesterol dilakukan dengan dipindahkan sebanyak 0,5 ml larutan baku kolesterol 1000 ppm ke dalam labu ukur 5,0 ml. Ke dalam labu ukur tersebut, larutan diencerkan dengan kloroform hingga

tanda batas volume 5 ml dan dikocok kuat-kuat. Larutan standar kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan 2 ml asam asetat anhidrat dan 0,1 ml asam sulfat pekat. Tabung reaksi dilapisi dengan alumunium foil sehingga larutan terhindar dari paparan sinar matahari. Absorbansi larutan standar diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum tiap 2 menit dari menit ke 0 hingga menit ke 30. Hasil pengukuran kemudian diamati hubungan antara waktu pengukuran dan nilai absorbansinya sehingga dapat diketahui waktu pengukuran yang stabil/ *operating time* (Amin, 2015; Ilyas et al., 2020; Lindawati dan Ningsih, 2020).

2.2.5.4 Pembuatan kurva baku

Pembuatan kurva baku diawali dengan pembuatan larutan seri kolesterol dengan konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm. Pembuatan larutan seri kolesterol dilakukan dengan memindahkan masing-masing sebanyak 3,0 3,5, 4,0, 4,5, dan 5,0 mL larutan induk kolesterol 1000 ppm ke dalam labu ukur 5 mL kemudian ditambahkan dengan kloroform hingga tanda batas. Masing-masing larutan dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan asam asetat anhidrat sebanyak 2,0 ml dan asam sulfat pekat sebanyak 0,1 ml. Tabung reaksi dilapisi dengan alumunium foil sehingga larutan terhindar dari paparan sinar matahari. Larutan didiamkan selama *operating time* dan absorbansi larutan seri kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan dibuat kurva hubungan antara konsentrasi dan absorbansi (Amin, 2015; Ilyas et al., 2020; Lindawati dan Ningsih, 2020).

2.2.5.5 Penentuan aktivitas antikolesterol

Penentuan aktivitas antikolesterol diawali dengan pembuatan larutan standar kolesterol dengan konsentrasi 100 ppm. Pembuatan larutan standar kolesterol dilakukan dengan dipindahkan sebanyak 2,5 ml larutan baku kolesterol 1000 ppm ke dalam labu ukur 25 ml. Ke dalam labu ukur tersebut, larutan diencerkan dengan kloroform hingga tanda batas volume 25 ml dan dikocok kuat-kuat. Larutan standar kemudian dipindahkan ke dalam lima tabung reaksi berbeda dan ke dalam masing-masing tabung direaksikan dengan 2 ml asam asetat anhidrat dan 0,1 ml asam sulfat pekat. Tabung reaksi dilapisi dengan *alumunium foil* sehingga larutan terhindar dari paparan sinar matahari dan larutan didiamkan selama *operating time* hingga terbentuk respon warna menjadi hijau. Selanjutnya dibuat larutan stok ekstrak kombinasi daun afrika dan pohon pinus dengan rasio 1:1 dan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut kemudian dilanjutkan dengan menyiapkan larutan seri ekstrak dengan konsentrasi 50, 75, 100, 125, dan 150 ppm dalam labu ukur 10 ml. Ekstrak kemudian diencerkan dengan etanol 96% hingga tanda batas dan diaduk hingga larut. Masing-masing larutan ekstrak kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi berisi kolesterol yang telah direaksikan dengan asam asetat

anhidrat dan asam sulfat pekat. Dalam larutan tersebut kemudian diamati perubahan warna yang terbentuk dan dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Amin, 2015; Ilyas et al., 2020; Lindawati dan Ningsih, 2020). Data absorbansi dari larutan sampel kemudian digunakan untuk menghitung kadar kolesterol dalam larutan tersebut dan persentase kadar penurunan kolesterol dihitung menggunakan persamaan:

$$A=(C-B)/C \times 100\%$$

Keterangan:

A = % penurunan kolesterol

B = Absorbansi baku+sampel

C = Absorbansi kontrol/ baku

(Anggraini and Nabillah, 2018)

Nilai EC50 dihitung berdasarkan persamaan regresi linier antara konsentrasi larutan uji dari ekstrak daun afrika dan daun pinus dengan presentase kadar penurunan kolesterol, yaitu:

$$Y=bx+a$$

Keterangan:

y = % penurunan kolesterol

x = konsentrasi sampel

a = *intercept*

b = *slope* kemiringan kurva

(Lindawati dan Ningsih, 2020).

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Hasil Ekstraksi

Saat ini, penggunaan obat herbal yang berasal dari tanaman obat banyak diminati oleh masyarakat sebagai terapi alternatif karena selain berkhasiat, obat tradisional cenderung lebih murah dan aman jika digunakan pada takaran yang tepat dibandingkan dengan obat konvensional yang cenderung mahal dan dapat menimbulkan efek samping serta kontraindikasi yang merugikan (Anneke dan Sulistyarningsih, 2018; Ashfaq, dkk., 2013). Pemanfaatan bahan alam sebagai obat-obatan telah dilakukan sejak ribuan tahun lalu sebagai upaya penyembuhan penyakit yang dilakukan secara turun-temurun hingga akhirnya pengetahuan tersebut berkembang menjadi ilmu farmakoterapi modern (Nasri dan Rafieian-Kopaei, 2014; Petrovska, 2012). Saat ini, obat tradisional banyak digunakan di seluruh dunia khususnya di negara-negara berkembang, tetapi kurangnya bukti klinis serta penelitian ilmiah yang membuktikan kandungan bahan aktif dan khasiat terapeutik tanaman obat membuat ramuan obat tradisional tidak dapat dimanfaatkan secara maksimal sebagai bahan obat baru (Caesar and Cech, 2019; Che dkk., 2013). Saat ini meningkatnya prevalensi dan perkembangan penyakit kardiovaskular menyebabkan relevansi yang sangat tinggi dari studi penemuan obat atau tanaman obat herbal yang dapat digunakan secara rutin untuk mengendalikan dan mencegah aterosklerosis dan gangguan kardiovaskular dalam jangka panjang tanpa resiko timbulnya efek samping (Sedighi, 2017; Kirichenko, 2020). Karena itu, berbagai penelitian

mengenai aktivitas dan senyawa bioaktif dalam tanaman herbal telah banyak dilakukan sebagai upaya dalam menemukan dan mengembangkan obat alternatif yang dapat memberikan manfaat bagi kesehatan, termasuk mencegah dislipidemia (Anneke dan Sulistyanyingsih, 2018; Ashfaq, dkk., 2013).

Dalam pengolahan senyawa bioaktif sebagai bahan obat, kandungan senyawa bioaktif dalam tanaman harus melalui rangkaian uji klinis untuk memverifikasi dan mengevaluasi manfaat serta keamanan penggunaan dari kandungan senyawa bioaktif tersebut sebelum bahan tersebut dapat dimanfaatkan sebagai obat dan digunakan secara luas (Sasidharan et al., 2011). Pengolahan senyawa fitokimia dalam tanaman umumnya diawali dengan tahap ekstraksi, yaitu proses pemisahan metabolit tumbuhan terlarut, dan memisahkannya dari bagian yang tidak larut/residu dengan bantuan pelarut selektif (Zhang et al., 2018). Ekstraksi diperlukan untuk memperoleh kandungan senyawa aktif dan komponen biokimia yang diinginkan dari bahan tanaman sehingga dapat dilakukan karakterisasi dan uji aktivitas lebih lanjut (Sasidharan et al., 2011). Pada penelitian ini dilakukan pembuatan ekstrak daun afrika (*Vernonia amygdalina*) dan ekstrak daun pinus (*Pinus merkusii*) sehingga dapat diteliti efek dan manfaat terapeutik dari tanaman tersebut dalam menurunkan kadar kolesterol. Daun afrika dan pohon pinus merupakan salah satu dari tanaman herbal yang banyak terdapat di Indonesia dan dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan sebagai antioksidan, antiinflamasi, menurunkan kadar kolesterol dan mencegah dislipidemia. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak dari kedua tanaman tersebut memiliki aktivitas hipolipidemik sehingga ekstrak dapat dimanfaatkan sebagai antikoolesterol.



Gambar 3.1 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Afrika dan Daun Pinus

Pada penelitian ini, sampel tanaman obat dipersiapkan terlebih dahulu sebelum dilakukan ekstraksi dengan tujuan untuk mengawetkan kandungan senyawa dan biomolekul dalam tanaman dan mencegah kandungan senyawa aktif potensial menjadi hilang, hancur, atau terdistorsi (Sasidharan et al., 2011). Sampel berupa daun afrika dan daun pinus mula-mula dikumpulkan dan diidentifikasi untuk menghindari kesalahan dan memastikan apakah sampel yang dikumpulkan sesuai dengan sampel yang hendak diteliti. Sampel yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan

dari partikel debu, kotoran, dan tanah dengan dicuci menggunakan air mengalir. Pada penelitian ini digunakan sampel daun kering karena sampel daun segar cenderung bersifat rapuh dan mudah rusak sehingga penelitian menggunakan sampel segar dilakukan dalam periode waktu singkat (Zhang et al., 2018; Azwanida, 2015). Sampel daun kemudian dikeringkan dengan diangin-anginkan di tempat dengan suhu kamar dan terhindar dari cahaya matahari dengan paparan suhu tinggi atau sinar matahari langsung (Azwanida, 2015). Setelah daun afrika dan daun pinus kering sepenuhnya, sampel kering kemudian dihancurkan menggunakan mortar dan alu kemudian dihaluskan menjadi serbuk menggunakan blender. Penggilingan atau *grinding* dilakukan agar diperoleh sampel berbentuk serbuk halus dan berukuran homogen. Ekstraksi dengan ukuran partikel kecil dapat menghasilkan kontak permukaan yang lebih luas, sehingga meningkatkan penetrasi pelarut, dan meningkatkan difusi zat terlarut sehingga menghasilkan ekstrak yang lebih baik (Zhang et al., 2018; Azwanida, 2015). Serbuk simplisia kemudian diletakkan dalam wadah bersih tertutup rapat untuk mencegah kontaminasi dan disimpan di tempat kering.



Gambar 3.2 Proses Perendaman atau Maserasi

Ekstraksi merupakan salah satu tahapan awal dalam analisis dan pengembangan senyawa obat yang terdiri atas proses pemisahan kandungan senyawa bioaktif dari residu dengan menggunakan pelarut selektif (Zhang et al., 2018). Saat ini terdapat berbagai prosedur yang dapat digunakan dalam ekstraksi bahan aktif tanaman obat. Pada penelitian ini metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Metode maserasi atau perendaman merupakan teknik ekstraksi konvensional yang sederhana namun efektif dan telah banyak digunakan secara luas dalam penelitian bahan tanaman obat. Metode maserasi dapat dilakukan untuk produk ekstrak yang tidak tahan panas dan dapat dilakukan dalam volume besar, sehingga metode maserasi dapat dilakukan untuk memisahkan senyawa fitokimia seperti flavonoid, tanin, saponin, serta senyawa aktif lainnya yang dapat terdegradasi akibat paparan suhu tinggi sehingga mempengaruhi khasiat dan efektivitas ekstrak kental yang didapat (Zhang et al., 2018; Abubakar dan Haque, 2020). Pada ekstraksi maserasi, bahan tanaman kasar berupa daun, kulit batang atau bahan halus berupa serbuk simplisia direndam dalam wadah tertutup berisi pelarut dengan tujuan untuk menghancurkan dinding sel

tumbuhan dan melepaskan kandungan senyawa fitokimia terlarut. Pada penelitian ini, pembuatan ekstrak diawali dengan menempatkan 500 gram serbuk simplisia ke dalam bejana kaca tertutup. Ke dalam bejana ditambahkan cairan penyari berupa etanol 70% sebanyak 3,75 liter dengan perbandingan 1:7,5 bagian hingga serbuk simplisia terendam sepenuhnya dalam bejana.

Pada ekstraksi pelarut seperti maserasi, pemilihan pelarut sangat penting dalam ekstraksi pelarut dan dapat mempengaruhi efisiensi ekstraksi dan perolehan senyawa zat aktif dalam sampel ekstrak yang dihasilkan (Zhang et al., 2018). Pemilihan pelarut dilakukan berdasarkan hukum kesamaan dan intermisibilitas dimana pelarut dengan nilai polaritas yang mendekati polaritas zat terlarut akan berkinerja lebih baik begitu pula sebaliknya. Pelarut dalam ekstraksi dapat diklasifikasikan menurut kepolarannya, dari n-heksana yang bersifat paling tidak polar hingga air yang bersifat paling polar (Abubakar dan Haque, 2020). Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol 70%. Pelarut alkohol seperti etanol dan metanol merupakan pelarut universal yang bersifat polar, sehingga banyak dimanfaatkan dalam ekstraksi metabolit sekunder yang bersifat polar, seperti senyawa fenolik dan flavonoid. Alkohol tidak memerlukan panas yang tinggi untuk mengonsentrasikan ekstrak, tetapi juga bersifat mudah terbakar dan mudah menguap (Abubakar dan Haque, 2020).



Gambar 3.3 Hasil Pengentalan Ekstrak

Ekstrak kemudian disaring dengan filtrasi menggunakan kain saring dan kertas saring untuk memisahkan ekstrak dari residu padat dan memastikan tidak ada ampas daun yang terbawa dalam ekstrak cair. Filtrat kemudian diuapkan menggunakan waterbath untuk menghilangkan pelarut dalam ekstrak sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian ditimbang beratnya dan disimpan dalam desikator. Setelah ditimbang berat ekstrak daun afrika dan ekstrak daun pinus, dihitung rendemen dari masing-masing ekstrak tersebut. Rendemen ekstrak adalah banyaknya ekstrak yang diperoleh selama proses ekstraksi yang dinyatakan dalam bentuk persen perbandingan berat produk ekstrak dengan berat bahan baku simplisia yang digunakan. Perhitungan rendemen ekstrak bertujuan untuk mengetahui jumlah kandungan senyawa bioaktif dan metabolit sekunder yang terlarut atau terekstraksi

selama proses perendaman dalam pelarut etanol 70%. Semakin tinggi nilai rendemen suatu ekstrak, maka semakin tinggi pula kandungan senyawa aktif dalam sampel ekstrak, sehingga semakin tinggi pula potensi efek terapeutik dan kemanjuran ekstrak tersebut sebagai bahan obat herbal (Utami et al., 2020; Supartini dan Cahyono, 2020; Hasnaeni dan Wisdawati, 2019). Dari pengukuran berat ekstrak dan berat serbuk simplisia dapat dihitung persen rendemen ekstrak dimana pada ekstrak daun afrika rendemen yang dihasilkan sebanyak 13,002% sedangkan rendemen ekstrak daun pinus sebanyak 12,632%.

Tabel 3.1 Hasil perhitungan rendemen ekstrak

Ekstrak	Berat serbuk	Berat ekstrak	% Rendemen
<i>Vernonia amygdalina</i>	500 g	65,01 g	13,002%
<i>Pinus merkusii</i>	500 g	63,16 g	12,632%

3.2 Hasil Skrining Fitokimia

Setelah diperoleh ekstrak kental daun afrika dan daun pinus, penelitian dilanjutkan dengan uji skrining fitokimia. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui konstituen dan jenis senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman. Senyawa fitokimia yang banyak terkandung dalam ekstrak herbal meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, fenolat, saponin, steroid, glikosida, terpen dan lain-lain. Kandungan senyawa fitokimia atau metabolit sekunder berkontribusi dalam aktivitas farmakologis dalam tanaman dan dapat memberikan berbagai manfaat biologis dan aplikasi terapeutik. Sehingga ekstrak tanaman tersebut dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan pada penemuan bahan obat baru dan pencegahan penyakit (Agbafor and Nwachukwu, 2011). Senyawa fitokimia tersebut telah banyak diteliti khasiat serta manfaatnya. Penelitian menunjukkan bahwa kandungan metabolit sekunder dapat bermanfaat bagi manusia dikarenakan efek terapeutiknya yang beragam, seperti antioksidan, antikanker, antidiabetik, antiaterosklerosis, antiinflamasi, antibakteri, antijamur, imunomodulator, dan efek renoproteksi atau hepatoprotektif.

Uji skrining fitokimia dilakukan melalui serangkaian uji kualitatif dan adanya kandungan senyawa fitokimia dalam ekstrak umumnya ditandai dengan parameter tertentu, seperti perubahan warna (Nasri dan Rafieian-Kopaei, 2014; Wang, et al., 2020). Pada penelitian ini dilakukan uji kualitatif untuk mendeteksi kandungan senyawa fitokimia yang berpotensi sebagai antikolesterol, seperti flavonoid, tanin, saponin, fenolik, dan steroid. Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa flavonoid, dapat dilakukan melalui uji Shinoda/Shinoda test. Pada uji Shinoda, ke dalam sampel ditambahkan dengan serbuk magnesium dan asam klorida pekat, adanya kandungan flavonoid ditandai dengan timbulnya warna kuning (Lindawati dan Ningsih, 2020; Anggraini dan Ali, 2017), merah lembayung, atau

merah muda pada larutan (De Silva, et al., 2017). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa fenolik, dapat dilakukan melalui uji uji $FeCl_3$ / *Ferric chloride test*. Pada uji $FeCl_3$, ke dalam sampel ditambahkan dengan larutan $FeCl_3$ dan timbulnya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat pada larutan menandakan adanya kandungan fenolik pada larutan sampel (Ifora dan Wijaya, 2018; Lindawati dan Ningsih, 2020; De Silva, et al., 2017). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa saponin, dapat dilakukan melalui uji busa/*frothing test* atau *foam test*. Pada uji busa, ke dalam sampel ditambahkan dengan air panas dan dikocok kuat-kuat, adanya kandungan saponin ditandai dengan timbulnya buih yang stabil pada permukaan larutan (Lindawati dan Ningsih, 2020). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa tanin, dapat dilakukan melalui uji gelatin. Pada uji gelatin, ke dalam sampel ditambahkan dengan larutan gelatin dalam natrium klorida, adanya kandungan tanin ditandai dengan timbulnya endapan putih pada larutan (Ifora dan Wijaya, 2018; De Silva, et al., 2017). Untuk mengetahui adanya kandungan senyawa steroid, dapat dilakukan melalui uji Liebermann Burcard. Pada uji steroid, ke dalam sampel dilarutkan dalam kloroform kemudian ditambahkan dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat, adanya kandungan steroid ditandai dengan timbulnya warna merah muda, merah, atau hijau biru pada larutan (Lindawati dan ningsih, 2020). Dari hasil skrining fitokimia, diketahui bahwa pada ekstrak daun afrika mengandung senyawa tanin, saponin, fenolik, dan steroid sedangkan pada ekstrak daun pinus mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, fenolik, dan steroid.

Tabel 3.2 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Afrika

Pengujian	Pengamatan Daun Afrika	Hasil
Uji flavonoid	Biru kehitaman	Negatif (-)
Uji tanin	Kuning keabu-abuan dengan endapan hitam	Positif (+)
Uji saponin	Kuning kehijauan dengan busa 1 cm selama 10 menit	Positif (+)
Uji fenolik	Hjau kebiruan	Positif (+)
Uji steroid	Bagian atas jingga kemerahan sedangkan bawah hijau gelap	Positif (+)

Tabel 3.3 Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daun Pinus

Pengujian	Pengamatan Daun Pinus	Hasil
Uji flavonoid	Cokelat	Positif (+)

	kemerahan	
Uji tanin	Kuning terang dengan endapan putih dan hitam	Positif (+)
Uji saponin	Kuning terang dengan busa 1 cm selama 10 menit	Positif (+)
Uji fenolik	Biru keabu-abuan	Positif (+)
Uji steroid	Bagian atas jingga kemerahan sedangkan bawah kuning kehijauan	Positif (+)

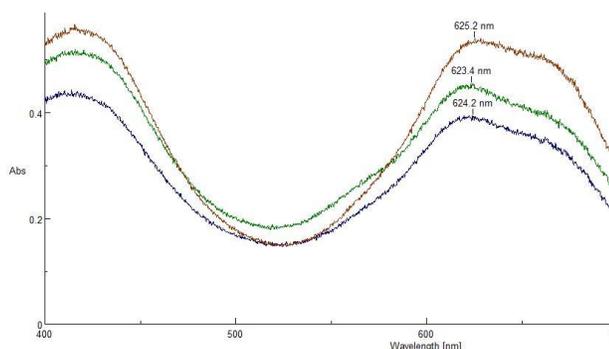
3.3 Hasil Uji Antikolesterol

Penelitian dilanjutkan dengan uji aktivitas penurunan kolesterol pada ekstrak daun afrika dan daun pinus. Pada penelitian ini, uji antikolesterol dilakukan menggunakan metode Liebermann-Burchard. Pada uji Liebermann-Burchard, ke dalam sampel ditambahkan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Sesuai dengan prinsip reaksi Liebermann-Burchard, senyawa kolesterol yang telah dilarutkan akan bereaksi dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat sehingga menghasilkan respon berupa warna hijau kebiruan. Pada reaksi Liebermann-Burchard, senyawa kolesterol yang dilarutkan dalam kloroform akan bereaksi dengan asam asetat sehingga membentuk senyawa turunan turunan asetil dari steroid. Penambahan asam asetat juga bertujuan untuk menghindarkan sampel dari kandungan air. Senyawa kolesterol umumnya bersifat sensitif dan tidak stabil terhadap air atau paparan cahaya, sehingga adanya kandungan air dapat mempengaruhi hasil pembacaan absorbansi dan kadar kolesterol sampel. Penambahan asam sulfat bertujuan untuk membentuk kompleks senyawa dengan senyawa steroid dan kolesterol yang ditandai dengan timbulnya warna hijau dalam sampel (Anggani and Nabillah, 2018). Metode Liebermann-Burchard telah banyak digunakan pada penelitian mengenai aktivitas antikolesterol ekstrak secara in vitro. Prinsip dari uji antikolesterol tersebut adalah penurunan kadar kolesterol bebas dalam sampel yang ditandai dengan kompleks senyawa berwarna yang dihasilkan, dimana semakin besar kadar kolesterol bebas dalam sampel, maka warna yang dihasilkan akan semakin pekat, begitu pula sebaliknya.

3.3.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui daerah panjang gelombang yang memberikan nilai serapan cahaya maksimum untuk senyawa kolesterol yang dapat diketahui dengan mengukur nilai absorbansi larutan standar kolesterol dalam rentang panjang gelombang UV-Visible. Pengukuran absorbansi dilakukan pada

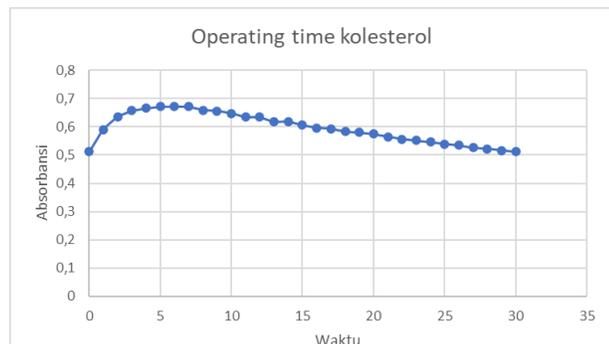
panjang gelombang maksimum dikarenakan absorbansi pada panjang gelombang maksimum bersifat lebih stabil dan memiliki kepekaan yang lebih maksimal, sehingga dapat meminimalkan kesalahan yang disebabkan oleh perubahan nilai absorbansi tiap satuan konsentrasi (Sahara et al., 2021). Dari hasil pembacaan panjang gelombang, diketahui bahwa nilai absorbansi tertinggi terdapat pada puncak kurva absorbansi, yaitu pada panjang gelombang 625,2 nm, 623,4 nm dan 624,2 nm. Sehingga pada pengukuran aktivitas antikoolesterol dengan metode Liebermann-Burcard, absorbansi larutan sampel diukur pada panjang gelombang dengan nilai serapan maksimum dari larutan standar kolesterol, yaitu sebesar 624 nm.



Gambar 3.4 Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum

3.3.2 Penentuan *Operating Time*

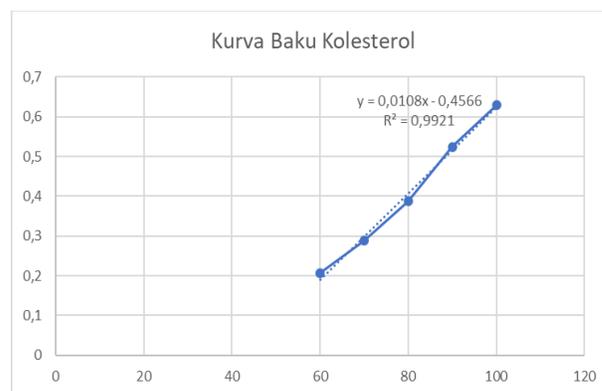
Operating time atau waktu kerja merupakan waktu yang dibutuhkan larutan kolesterol untuk bereaksi dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dan menghasilkan warna dan nilai absorbansi sampel yang stabil (Lindawati dan Ningsih, 2020). Dari hasil pembacaan *operating time* dibuat kurva hubungan antara absorbansi dengan waktu dan pada puncak kurva tersebut menunjukkan nilai absorbansi tertinggi, dimana absorbansi larutan sampel kolesterol tampak stabil pada rentang menit ke 4 hingga menit ke 8. Sehingga pada pengukuran aktivitas antikoolesterol dengan metode Liebermann-Burcard, waktu yang dibutuhkan larutan standar kolesterol untuk bereaksi dan menghasilkan nilai absorbansi yang stabil adalah 6 menit.



Gambar 3.5 Hasil pengukuran *operating time*

3.3.3 Pembuatan Kurva Baku

Setelah diperoleh nilai panjang gelombang maksimum dan *operating time* larutan kolesterol, penelitian dilanjutkan dengan pembuatan kurva baku kolesterol. Kurva baku kolesterol dibuat dengan membandingkan nilai konsentrasi kolesterol dan absorbansi, pembuatan kurva baku bertujuan untuk memperoleh persamaan regresi linier yang digunakan dalam menghitung kadar kolesterol dalam larutan sampel pada uji antikoolesterol, serta nilai koefisien korelasi yang menunjukkan linearitas suatu analisis yang diperoleh melalui konsentrasi dan absorbansi kolesterol (Sahara et al., 2021). Pada penelitian ini, pembuatan kurva baku dilakukan dengan pembuatan seri larutan dengan konsentrasi 60, 70, 80, 90, dan 100 ppm, masing-masing larutan tersebut direaksikan dengan 2,0 mL asam asetat anhidrat dan 0,1 mL asam sulfat pekat. Larutan kemudian didiamkan di tempat yang terhindar dari paparan cahaya selama 6 menit kemudian diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 624 nm. Dari nilai absorbansi tersebut kemudian dibuat kurva yang menyatakan hubungan konsentrasi dan nilai absorbansinya sehingga dapat dibuat kurva baku kolesterol (Amin, 2015; Ilyas et al., 2020; Lindawati dan Ningsih, 2020). Dari hasil pembacaan absorbansi larutan seri kolesterol, dibuat kurva baku kolesterol yang menyatakan hubungan antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh persamaan garis regresi linier, yaitu $y=0,0108x-0,4566$. Dimana dalam persamaan linier, nilai a adalah perpotongan kurva pada sumbu y , sedangkan nilai b menunjukkan kemiringan kurva. Selain itu, dari kurva tersebut juga diketahui nilai koefisien korelasi (R^2) sebesar 0,9921. Dari hasil tersebut juga dapat diketahui bahwa kurva baku tersebut memiliki linearitas yang baik, hal tersebut dapat dilihat dari nilai koefisien korelasinya yang mendekati 1 (Sahara et al., 2021).



Gambar 3.6 Hasil pembuatan kurva baku

3.3.4 Hasil Uji Antikoolesterol

Pada uji antikoolesterol menggunakan metode Liebermann-Burcard, penurunan kadar kolesterol diukur menggunakan Spektrofotometri Ultraviolet dan Visible atau Spektrofotometri UV-Vis. Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis suatu sampel berdasarkan penyerapan cahaya dan panjang gelombang elektromagnetik, metode tersebut telah

banyak diaplikasikan dengan tujuan untuk memperoleh informasi terkait suatu sampel, seperti mengidentifikasi senyawa atau mengukur kemurnian larutan. Pengukuran penurunan kadar kolesterol menggunakan spektrofotometri UV-Vis didasarkan pada interaksi cahaya saat melewati permukaan sampel, dimana sebagian dari cahaya tersebut akan diabsorpsi dan sisanya akan ditransmisikan, sehingga menyebabkan penurunan intensitas cahaya setelah melewati sampel. Setiap sampel akan menyerap pancaran cahaya pada panjang gelombangnya masing-masing (De Caro and Haller 2015). Banyaknya cahaya yang diserap saat melewati sampel disebut sebagai nilai absorbansi, dimana semakin tinggi konsentrasi larutan sampel, maka semakin banyak cahaya yang akan diserap dan semakin sedikit cahaya yang ditransmisikan, sehingga semakin tinggi nilai absorbansinya.

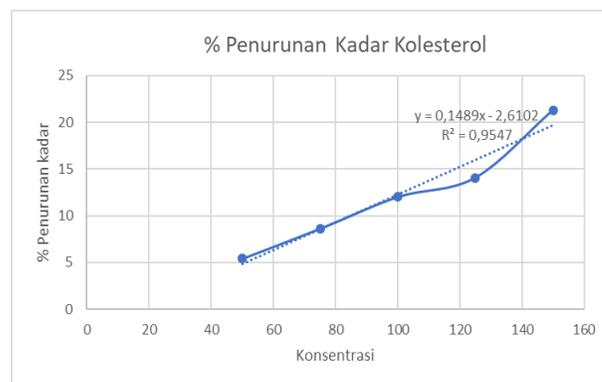
Prinsip dari uji antikoolesterol Liebrman Burchard adalah penurunan kadar kolesterol bebas dalam sampel yang ditandai dengan penurunan kadar kompleks senyawa berwarna yang dihasilkan. Semakin besar kadar kolesterol bebas dalam sampel, maka warna yang dihasilkan akan semakin pekat, begitu pula sebaliknya. Penelitian sebelumnya memaparkan bahwa mekanisme reaksi warna kolesterol dengan asam sulfat melibatkan dehidrasi awal menjadi kolestadien dan dilanjutkan dengan pembentukan dimer sulfonasi berwarna yang dapat mengalami polimerisasi lebih lanjut (Richmond, 1992). Pada reaksi Lieberman Burchard, asam asetat anhidrat (CH_3COOH) akan mengubah struktur kolesterol menjadi kolestadien dan asam sulfat pekat (H_2SO_4) akan diubah menjadi HSO_4 , H_3O , dan SO_3 , dimana masing-masing dari senyawa tersebut akan berikatan dengan kolestadien. Asam sulfonat kolestadien yang dihasilkan dari reaksi antara senyawa kolesterol dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat dapat berikatan dengan senyawa fitokimia yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan, seperti flavonoid. Gugus substituen dalam flavonoid akan berikatan dengan asam sulfonat, mengganggu gugus hidroksil, sehingga semakin banyak gugus flavonoid yang berikatan, maka kadar kolesterol bebas akan semakin sedikit sehingga menyebabkan warna biru kehijauan pada larutan akan memudar (Sahara et al., 2021).



Gambar 3.7 Larutan Seri Kombinasi Ekstrak Uji

Antikoolesterol

Banyaknya cahaya yang diserap saat melewati sampel dinyatakan sebagai nilai absorbansi, dimana semakin tinggi konsentrasi larutan sampel, maka semakin banyak cahaya yang akan diserap dan semakin sedikit cahaya yang ditransmisikan, sehingga semakin tinggi nilai absorbansinya. Semakin tinggi kandungan kolesterol bebas dalam larutan sampel, maka warna larutan yang dihasilkan akan semakin pekat, sehingga larutan tersebut akan lebih banyak menyerap pancaran cahaya dan menyebabkan peningkatan nilai absorbansi (Suhartati, 2017).



Gambar 3.8 Hasil pengukuran antikoolesterol

Hasil pengukuran absorbansi dan perhitungan kadar kolesterol menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol daun afrika dan daun pinus pada konsentrasi 50 ppm dapat menurunkan kadar kolesterol bebas dalam larutan sampel kolesterol 100 ppm sebanyak 5,41%, sedangkan kombinasi ekstrak etanol daun afrika dan daun pinus pada konsentrasi 150 ppm dapat menurunkan kadar kolesterol bebas dalam larutan sampel kolesterol 100 ppm sebanyak 21,29%. Nilai EC_{50} atau Effective Concentration merupakan konsentrasi ekstrak daun afrika dan daun pinus yang dibutuhkan untuk menurunkan kadar kolesterol bebas sebesar 50%. Nilai EC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier $Y = bx + a$, dimana nilai X merupakan kadar ekstrak dan Y adalah persentase penurunan kadar kolesterol (Sahara et al., 2021; Angraini and Nabillah, 2018). Dari perhitungan nilai EC_{50} dapat diketahui bahwa untuk memperoleh penurunan kadar kolesterol sebanyak 50%, maka dibutuhkan ekstrak etanol daun afrika dan daun pinus sebesar 4671,91 ppm. Dari analisis penurunan kadar kolesterol bebas, dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak etanol akan menyebabkan peningkatan kadar kolesterol terikat dan penurunan kadar kolesterol bebas, sehingga menyebabkan penurunan kepekatan warna dan nilai absorbansi dari larutan sampel. Dari perhitungan kadar tersebut juga dapat diketahui bahwa kombinasi ekstrak daun afrika dan daun pinus memiliki aktivitas antikoolesterol secara in vitro. Penurunan kadar kolesterol disebabkan oleh adanya metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol daun afrika dan daun

pinus yang memiliki aktivitas sebagai antikolesterol, seperti flavonoid, tanin, saponin, fenolik, dan steroid. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki peran serta manfaat dalam menurunkan resiko penyakit kardiovaskular, seperti hipertensi dan stroke dengan menurunkan konsentrasi kolesterol darah, menurunkan tekanan darah, dan menurunkan endapan kolesterol.

4 Simpulan dan Saran

Dari hasil penelitian ini diketahui bahwa dalam ekstrak daun afrika dan daun pinus mengandung senyawa bahan aktif yang bermanfaat sebagai antikolesterol, seperti: flavonoid, fenolik, tanin, saponin, dan steroid. Sedangkan hasil uji antikolesterol dengan metode Liebermann-Burchard menunjukkan bahwa ekstrak daun afrika dan daun pinus dapat menurunkan kadar kolesterol secara in vitro, sehingga ekstrak tersebut memiliki aktivitas antikolesterol dengan daya hambat EC50 sebesar 4671,91 ppm.

Beberapa saran yang diberikan untuk penelitian selanjutnya meliputi: pada penelitian selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan jenis pelarut dan konsentrasi yang berbeda, dilakukan isolasi senyawa bahan aktif dengan aktivitas antikolesterol, dilakukan pembuatan sediaan ekstrak sebagai obat penurun kolesterol yang aman digunakan, dan dilakukan uji aktivitas antikolesterol ekstrak secara in vivo

Daftar Pustaka

- Abubakar, A. R., Haque, M. (2020). *Preparation Of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes*, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1):1
- Agbafor, K. N. and Nwachukwu, N. (2011), *Phytochemical Analysis and Antioxidant Property of Leaf Extracts of Vitex doniana and Mucuna pruriens*. *Biochemistry research international*, 2011: 1-4
- Ahmed, S. S. (2020), *Treating Dyslipidemia in Adults: An Update*, *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 32: 114–135
- Amin, M. S. (2015), Studi In-Vitro: 'Efek Antikolesterol dari Ekstrak Metanol Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) terhadap Kolesterol Total', Skripsi, UIN Syarif Hidayatulla, Jakarta
- Anggraini, D. I. dan Ali, M. M. (2017), Uji Aktivitas Antikolesterol Ekstrak Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) Secara In Vitro, *Jurnal Ilmiah Kesehatan*, 9(1): 1-6
- Anggraini, D. I., Kusuma, E. W. (2019), Uji Potensi Fraksi Etil Asetat Kulit Buah Apel Hijau (*Pyrus Malus L.*) Terhadap Penurunan Kadar Kolesterol Secara In Vitro, *Cendekia Eksakta*, 4(1): 7-15
- Anggraini, D. I., Nabillah, L. F. (2018), *Activity Test of Suji Leaf Extract (Dracaena angustifolia Roxb.) on In Vitro Cholesterol Lowering*, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 21(2): 54–58
- Anneke, A., Sulistyaningsih (2018), Review: Terapi Herbal Sebagai Alternatif Pengobatan Dislipidemia, *Farmaka*, 16(1): 316-324
- Ardiani, R. (2017), Efek Antikolesterol Ekstrak Etanol Daun Pinus (*Vernonia amygdalina Del.*) pada Tikus, *Jurnal Penelitian Pendidikan MIPA*, 2(1): 153-158
- Ashfaq, U. A., Mumtaz, A., Qamar, T. U., Fatima, T. (2013), *MAPS Database: Medicinal plant Activities, Phytochemical and Structural Database*, *Bioinformation*, 9(19): 993–995
- Azwanida, N. N. (2015), *A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation*, *Med Aromat Plants*, 4(196): 2167-0412
- Caesar, L. K., Cech, N. B. (2019), *Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+ 1 does not equal 2*, *Natural product reports*, 36(6): 869-888
- Che, C. T., Wang, Z. J., Chow, M. S. S., Lam, C. W. K. (2013), *Herb-Herb Combination for Therapeutic Enhancement and Advancement: Theory, Practice and Future Perspectives*, *Molecules*, 18(5): 5125-5141
- De Caro, C., Haller, C. (2015) *UV-VIS Spectrophotometry-Fundamentals and Applications*, *Mettler-Toledo International*, 4-14
- De Silva, G. O., Abeyundara, A. T., Aponso, M. M. W. (2017), *Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants*, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5(2): 29-32
- Erwianto, Santoso, A., Putranto, J.N.E., Tedjasukmana, P., Sukmawan, R., Suryawan, R. (2017), *Panduan Tata Laksana Dislipidemia 2017*, Perhimpunan Dokter Spesialis Kardiovaskular Indonesia, Jakarta
- Gau, G. T., Wright, R. S. (2006), *Pathophysiology, Diagnosis, and Management of Dyslipidemia*, *Current Problems in Cardiology*, 31(7): 445–486
- Haiyun, W. U., Bei, J., Guo, J. (2009), *Chinese Herbal Medicine for Treatment of Dislipidemia*, *Journal of Geriatric Cardiology*, 6(2): 119-125
- Hasnaeni, H., Wisdawati, W. (2019), Pengaruh Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen dan Kadar Fenolik Ekstrak Tanaman Kayu Beta-Beta (*Lunasia amara Blanco*), *Jurnal Farmasi Galenika (Galenika Journal of Pharmacy)*, 5(2), 175-182
- Ifora, I., Kardela, W., Wijaya, Y. F. M., (2018), Efek Antikolesterol Ekstrak Etanol Buah Kundua (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) pada Mencit Putih Jantan, *Jurnal Farmasi Higea*, 10(2): 99-109
- Ilyas, A. N., Rahmawati, Widiastuti, H. (2020),

- Uji Aktivitas Antikolesterol Ekstrak Etanol Daun Gedi (*Abelmoschus Manihot* (L.) Medik) Secara In Vitro, *Window of Health: Jurnal Kesehatan*, 3(1): 057-064
- Jumiarni, W. O., Komalasari, O (2017), Eksplorasi Jenis dan Pemanfaatan Tumbuhan Obat pada Masyarakat Suku Muna di Permukiman Kota Wuna, *Traditional Medicine Journal*, 22(1): 45–56
- Kirichenko, T. V., Sukhorukov, V. N., Markin, A. M., Nikiforov, N. G., Liu, P. Y., Sobenin, I. A., et al. (2020), *MediCinal Plants as a Potential and Successful Treatment Option in the Context of Atherosclerosis*, *Frontiers in pharmacology*, 11: 403
- Lindawati, N. Y. dan Ningsih, D. W. (2020), Aktivitas Antikolesterol Ekstrak Etanol Buah Kiwi Hijau (*Actinidia deliciosa*), *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 6(2)
- Moza, P. G. (2019), ‘Perbandingan Efek Hipolipidemia Antara Ekstrak Etanol Daun *Pinus Merkusii* dengan *Pinus Bhutanica* pada Tikus Putih Galur Wistar’, Skripsi, Sarjana, Universitas Machung, Malang
- Nasri, H., Rafieian-Kopaei, M. (2014), Tumbuhan Obat Dan Antioksidan: Mengapa Tidak Selalu Bermanfaat?, *Jurnal kesehatan masyarakat Iran*, 43(2): 255–257
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. (2016), *Flavonoids: An Overview*, *Journal of Nutritional Science*, 5(47): 1-15
- Petrovska B. B., 2012, *Historical review of mediCinal plants' usage*. *Pharmacognosy reviews*, 6(11): 1–5
- Ramadhani, F. Girsang, E. (2021), *The Bioactive of Pinus Merkusii Needle and Bark Extract as Antioxidant And Antiaging*, *jurnal kimia dan pendidikan kimia*, 6(1): 78–88
- Richmond, W. (1992), *Analytical reviews in clinical biochemistry: the quantitative analysis of cholesterol*, *Annals of clinical biochemistry*, 29(6): 577-597
- Sahara, F. U., Slamet, S., Waznah, U., Wirasti, W (2021), November, Uji Aktivitas Antikolesterol Ekstrak Daun Puring (*Codiaeum variegatum* (L.) Rumph. Ex. A. Juss) Secara In Vitro, *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan*, 1: 487-498
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Yoga Latha, L. (2011), *Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts, African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 8(1): 1–10
- Sedighi, M., Bahmani, M., Asgary, S., Beyranvand, F., Rafieian-Kopaei, M. (2017), *A review of plant-based compounds and medicinal plants effective on atherosclerosis*, *Journal of research in medical sciences : the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 22: 30,
- Suhartati, T. (2017), *Dasar-Dasar Spektrofotometri UV-Vis Dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*, Perpustakaan Nasional RI, Bandar Lampung
- Supartini, S. Cahyono, D. D. N. (2020), Rendemen Akar, Batang dan Daun Pasak Bumi (*Eurycoma longifolia* Jack) Sebagai Bahan Baku Obat Herbal, *Jurnal Riset Teknologi Industri*, 14(2): 142-155
- Utami, N. F., Sutanto, S., Nurdayanty, S. M., Suhendar, U. (2020), Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi Pada Penentuan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Iler (*Plectranthus scutellarioides*), *FITOFARMAKA: Jurnal Ilmiah Farmasi*, 10(1), 76-83
- Wang, T. Y., Li, Q., Bi, K. S. (2018), *Bioactive Flavonoids in Medicinal Plants: Structure, Activity and Biological Fate*, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1): 12-23

