

**PENGARUH PEMBERIAN KLOROFIL TANAMAN
ALFALFA (*Medicago sativa*) TERHADAP KADAR
HDL (*High Density Lipoprotein*) DAN MDA
(*Malondialdehida*) PADA TIKUS PUTIH
(*Rattus novergicus*) YANG DIBERI
DIET TINGGI KOLESTEROL**

SKRIPSI

Oleh:

FAHMI ARIEF

115130100111033



**PROGAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

PENGARUH PEMBERIAN KLOROFIL TANAMAN ALFALFA (*Medicago sativa*) TERHADAP KADAR HDL (*High Density Lipoprotein*) DAN MDA (*Malondialdehida*) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) YANG DIBERI DIET TINGGI KOLESTEROL

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

FAHMI ARIEF

115130100111033



**PROGAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

PENGARUH PEMBERIAN KLOROFIL TANAMAN ALFALFA (*Medicago sativa*) TERHADAP KADAR HDL (*High Density Lipoprotein*) DAN MDA (*Malondialdehida*) PADA TIKUS PUTIH (*Rattus novergicus*) YANG DIBERI DIET TINGGI KOLESTEROL

Oleh:

FAHMI ARIEF
115130100111033

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 11 Maret 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS
NIP. 19520412 198002 1 001

drh. Dyah Ayu O.A.P, M. Biotech
NIP. 19841026 200812 2 004

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh., DES.
NIP. 19600903 198802 2 001

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Fahmi Arief
 Nim : 115130100111030
 Program studi : Kedokteran Hewan
 Penulis Skripsi berjudul :

Pengaruh Pemberian Klorofil Dari Tanaman Alfalfa (*Medicago Sativa*) Terhadap Kadar HDL (*Very Low Density Lipoprotein*) Dan MDA (*Malondialdehida*) Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Yang Diberi Diet Tinggi kolesterol.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.



Malang, 20 Januari 2016

Yang menyatakan,

(Fahmi Arief)

NIM. 115130100111033

**Pengaruh Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*)
Terhadap Kadar HDL (*HighDensity Lipoprotein*) Dan MDA
(*Malondialdehida*) Pada Tikus Putih (*Rattus novergicus*)
Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol**

ABSTRAK

Hiperkolesterolemia adalah penyakit gangguan metabolisme kolesterol yang disebabkan oleh kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal. Kondisi hiperkolesterol dapat ditandai dengan kenaikan kadar LDL yang meningkat menyebabkan kadar HDL tidak mampu membawa kolesterol berlebih untuk dibawa ke hati sehingga keadaan HDL menurun. Tingginya kadar LDL dan radikal bebas menstimuli proses peroksidasi lipid sehingga menghasilkan MDA berlebih. Salah satu alternatif yang dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah adalah klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) yang memiliki zat aktif saponin, fitol, dan flavonoid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh terapi klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap kadar *high Density Lipoprotein* (HDL) dan MDA (*Malondialdehida*). Variabel yang diamati adalah kadar HDL yang diukur secara spektrofotometri menggunakan alat *Biosystem tipe A 15* dan kadar MDA menggunakan uji TBA (*Thiobarbituric acid reactivity test*). Penelitian ini menggunakan 20 ekor tikus *Rattus norvegicus* jantan strain Wistar. Pembuatan hewan model tinggi kolesterol dengan induksi pakan hiperkolesterol selama 14 hari. Terapi dilakukan selama 14 hari dengan klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) dosis 0,36 mg/200 g, 0,72 mg/200 g dan 1,08 mg/200 g. Analisis yang digunakan untuk kadar *high Density Lipoprotein* (HDL) dan MDA (*Malondialdehida*) dalam penelitian ini adalah *One Way Analisis Of Variance* (ANOVA) dan apabila ada perbedaan antar perlakuan dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji Tukey 5%. Hasil penelitian menunjukkan terapi klorofil alfalfa dapat meningkatkan kadar HDL yang dan menurunkan kadar MDA secara sangat signifikan ($p < 0,01$). Hasil analisis membuktikan bahwa diantara perlakuan terapi klorofil alfalfa menunjukkan perbedaan yang sangat nyata terhadap peningkatan kadar HDL dan penurunan kadar MDA. Dosis terapi 1,08 mg/200 g BB merupakan dosis terbaik yang dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar MDA yaitu sebesar 105,29% dan 87,00%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah terapi klorofil alfalfa dapat digunakan sebagai terapi hiperkolesterol.

Kata kunci : Hiperkolesterol, klorofil tanaman alfalfa, HDL, MDA

The Effect of Chlorophyll from Alfalfa (*Medicago sativa*) to HDL (High Density Lipoprotein) and MDA (Malondialdehida) Weight in High cholesterol-Fed Rat (*Rattus norvegicus*)

ABSTRACT

Hypercholesterolemia is a disease of cholesterol metabolism disorders caused by the cholesterol levels in the blood exceeds normal limits. Hypercholesterolemia condition can be characterized by levels of LDL increased which causes HDL levels can't carry more cholesterol to liver, so it decreased HDL levels. High levels of LDL and free radicals stimulate lipid peroxidation process to produce overproduction MDA. One of the therapy to decrease cholesterol levels in the blood is chlorophyll from alfalfa (*Medicago sativa*) which contains saponin, fitols, and flavonoids. This research was aimed to determine the effect chlorophyll from Alfalfa (*Medicago sativa*) to levels of HDL and MDA (*Malondialdehida*). The variables observed were levels of HDL that measured using a Biosystems type A 15 and levels of MDA that using TBA test (thiobarbituric acid reactivity test). This study used 20 male rats (*Rattus norvegicus*) Wistar strain. Hypercholesterolemia animal models with induction of hypercholesterol feed in 14 days. This process was done for 14 days with a dose of chlorophyll from Alfalfa (*Medicago sativa*) dose as much as 0.36 mg / 200 g, 0.72 mg / 200 g and 1.08 mg / 200 g. The analysis for levels of *high density lipoprotein* (HDL) and MDA (*Malondialdehida*) in this study is One Way Analysis Of Variance (ANOVA) and if there are differences in treatments can be carried further analysis with Tukey test 5%. The results showed alfalfa chlorophyll therapy can increase levels of HDL and highly significantly decrease level of MDA ($p < 0.01$). Results of this analysis give the prove that among alfalfa chlorophyll therapy treatments showed a highly significant difference to the increase in HDL cholesterol and decrease levels of MDA. The dose of 1.08 mg / 200 g BW was the best dosage that can increase levels of HDL and decrease levels of MDA as much as 105.29% and 87.00%. The conclusion from this study is the alfalfa chlorophyll therapy can be used as a treatment of hypercholesterolemia.

Kata kunci : Hypercholesterolemia, Alfalfa chlorophyll, HDL, MDA

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dilimpahkan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago Sativa*) Terhadap Kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) Dan MDA (*Malondialdehida*) Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol**” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan (S.KH).

Penulis menyadari banyak pihak yang telah berpartisipasi dan membantu dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini. Untuk itu, iringan doa dan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya penulis sampaikan, utamanya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS, selaku dosen pembimbing pertama, yang mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
2. Drh. Dyah Ayu O.A.P, M. Biotech. selaku dosen pembimbing kedua, yang mengarahkan dan memberi bimbingan, kesabaran, fasilitas, dan waktu yang telah diberikan serta dukungan kepada penulis dalam penyusunan dan penyempurnaan skripsi ini.
3. Drh. Nurina Titisari, M.Sc selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan saran dan kritik kepada penulis.
4. Drh. Nurprimadita Rosendiani, selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan saran dan kritik kepada penulis.
5. Prof. Dr. Aulani'am, drh, DES, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya yang selalu memberikan dukungan tiada henti demi kemajuan FKH UB tercinta.
6. Keluarga penulis, Ibu, Ayah dan Adik tercinta yang selalu memberikan semangat, dorongan dan doa yang tiada henti.
7. Teman-teman kelompok penelitian “ Anggita, Romdhani, Irma dan Oca” atas semangat perjuangan bersama dalam penelitian ini.

8. Teman-teman angkatan 2011 B yang selalu semangat dalam berjuang bersama-sama dari awal masuk kuliah.
9. Claudya Fikayanti yang selalu menyemangati dalam pengerjaan skripsi ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan proposal penelitian skripsi ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan proposal skripsi ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk saran dan kritik yang membangun.

Malang, 20 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat	6
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Hiperkolesterol	7
2.1.1 Pengertian Hiperkolesterol	7
2.1.3 Patogenesis Hiperkolesterol	7
2.1.2 Hubungan Kadar <i>High Density Lipoprotein</i> (HDL) dengan Hiperkolesterol	9
2.2 Hubungan MDA Dengan Hiperkolesterol	10
2.3 Hewan Model Tikus Hiperkolesterol	11
2.4 Alfalfa	13
2.4.1 Klasifikasi Tanaman Alfalfa	13
2.4.2 Kandungan Bioaktif Tanaman Alfalfa	15
2.4.3 Komponen Klorofil Tanaman Alfalfa	16
BAB 3. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis	21
BAB 4. METODE PENELITIAN	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	22
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	22
4.2.1 Alat	22
4.2.2 Bahan	22
a. Bahan Pakan	23
b. Bahan Pemeriksaan HDL	23
c. Bahan Pemeriksaan MDA	23
4.3 Populasi hewan Coba	24
4.3.1 Sampel Penelitian dan Pengulangan	24
4.4 Tahapan Penelitian	25
4.5 Prosedur Kerja	26

4.5.1 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	26
4.5.2 Pembuatan Pakan Hiperkolesterol	26
4.5.3 Persiapan pada Hewan Coba Hiperkolesterol	27
4.5.4 Penyediaan Klorofil Tanaman Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L).....	28
4.5.5 Pengukuran Kadar Kolesterol Total Sebelum Terapi	29
4.5.6 Penentuan Dosis Klorofil Tanaman Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	30
4.5.7 Terapi Klorofil dari Tanaman Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	30
4.5.8 Pengambilan Serum darah Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	31
4.5.6.1. Pengambilan Serum Darah.....	31
4.5.9 Pengukuran Kadar HDL dengan Metode Spektrofotometri	32
4.5.10 Pembuatan Kurva Baku Malondialdehida (MDA).....	32
4.5.10.1 Pengukuran Kadar <i>Malondialdehida</i> (MDA)	32
4.6 Analisa Data	33
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Pengaruh Pemberian Terapi Klorofil Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) terhadap Kadar HDL Tikus Putih Hiperkolesterol.....	34
5.2 Pengaruh Pemberian Terapi Klorofil Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) terhadap Kadar MDA Tikus Putih Hiperkolesterol.....	38
BAB 6. PENUTUP	
6.1 Kesimpulan	43
6.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.2 Komposisi Komposisi Pakan Kontrol Dan Pakan Hiperkolesterol.....	23
4.5 Rancangan Kelompok Perlakuan	26
4.6.1 Hasil Analisa Kadar Kolesterol Total Sebelum Induksi Hiperkolesterol menggunakan <i>easy touch</i>	29
4.6.2 Hasil Analisa Kadar Kolesterol Total Induksi Hiperkolesterol menggunakan <i>easy touch</i>	30
5.1.1 Rata-Rata Pengukuran Kadar Kolesterol Total Sebelum Dan Sesudah Pemberian Pakan Hiperolesterol	34
5.2 Rata-Rata Kadar HDL.....	35
5.3 Rata-Rata Kadar MDA.....	38



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tikus Putih	13
Gambar 2.2 Tanaman Alfalfa.....	14
Gambar 2.2 Gambar 2.3 Struktur Kimia Hemoglobin dan Klorofil	16



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian	49
2. Induksi Hiperkolesterol	50
3. Hasil Analisis Laboratorium Kandungan Nutrisi Pakan	52
4. Perhitungan Dosis Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	53
4. Perhitungan Penurunan dan Peningkatan Kadar HDL serum	55
6. Hasil Uji Statistika Kadar HDL menggunakan SPSS ver. 22.0	56
7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA	59
7.1. Absorbansi larutan standard malondialdehida 4 ppm pada berbagai panjang gelombang	59
7.2. Absorbansi Larutan Standar Malodialdehida λ maksimal = 533 nm pada berbagai konsentrasi.	60
8. Absorbansi dan Konsentrasi kadar MDA	61
9. Perhitungan Peningkatan dan Penurunan Kadar MDA serum	62
10. Hasil Uji Statistika Kadar MDA menggunakan SPSS ver. 22.0	63
11. Hasil Uji LC-MS Klorofil	65
11. Setrifikat Layak Etik	69

DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

Simbol/Singkatan

Keterangan

ANOVA	<i>Analysis of Variant</i>
BB	Berat Badan
Cm	<i>centimeter</i>
G	<i>Gam</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
HE	<i>Hematoksin Eosin</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>
M	<i>Meter</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
Mg	<i>Milligam</i>
Mm	<i>Millimeter</i>
mg/dL	<i>milligam/deciliter</i>
RAL	Rancangan Acak Lengkap
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutio</i>
TBA	<i>Thiobarbituric Acid</i>
VLDL	<i>Very Low Density Lipoprotein</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
Rpm	<i>Revolution per minute</i>
ASI	Air susu ibu
Nm	<i>nanometer</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hiperkolesterol adalah keadaan kadar kolesterol di dalam darah melebihi normal. Kondisi tinggi kolesterol tidak hanya menyerang manusia tetapi juga dapat menyerang hewan khususnya hewan peliharaan seperti anjing dan kucing melalui pemberian *pet food* yang berupa daging dan jeroan pada hewan peliharaan. Kadar normal kolesterol 150-300 mg/dL pada anjing, 70-200 mg/dL pada kucing (Murray *et al.*, 2003 dan Bauer, 2004) dan pada tikus putih 100-140 mg/dL. Kucing atau anjing dapat mengalami tinggi kolesterol, namun anjing lebih rentan terhadap tinggi kolesterol (Laflamme, 2012). Prevalensi kejadian hiperkolesterolemia pada anjing di negara-negara barat sekitar 25% sampai 44% (Jeusette *et al.*, 2005). Hal tersebut juga diperkuat oleh Xernoulis and Steiner (2010) tinggi kolesterol menyerang anjing *Miniature Schnizer* sebanyak 32,8% di United State.

Kondisi dimana kolesterol dalam darah meningkat melebihi ambang normal yang ditandai dengan meningkatnya kadar kolesterol total terutama *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan diikuti dengan penurunan kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) darah (Bhatnagar *et al.*, 2008). Tubuh akan berusaha untuk menyeimbangkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara sintesis asam empedu ketika tubuh dalam kondisi tinggi kolesterol. Asam empedu yang disintesis oleh hati berbanding lurus dengan jumlah radikal bebas yang dihasilkan sebagai hasil sampingan (Wresdiyati dkk, 2006).

Penurunan kadar HDL darah dalam keadaan tinggi kolesterol merupakan salah satu faktor risiko terjadinya penyakit kardiovaskular yang dapat menyebabkan penyakit kardiovaskular karena telah terbukti memiliki peranan dalam mengganggu dan mengubah struktur pembuluh darah sehingga dapat mengganggu fungsi endotel dan menyebabkan lesi, plak, oklusi, dan emboli (Stapleton *et al.*, 2010).

Kondisi hiperkolesterol menyebabkan terjadinya peningkatan radikal bebas, dimana radikal bebas merupakan senyawa reaktif yang dapat merusak sel pada tubuh (Price *et al.*, 2006), apabila produksi radikal bebas terjadi berlebihan akan berakibat antioksidan dalam tubuh tidak mampu mengatasinya (Wresdiyati *et al.*, 2005). Malondialdehida (MDA) merupakan salah satu indikator dari radikal bebas. Semakin tinggi kadar radikal bebas pada suatu organ maka semakin tinggi kadar MDA (Luczaj *et al.*, 2003).

Obat yang diproduksi industri farmasi banyak macamnya namun penggunaannya dalam jangka panjang mempunyai efek samping sehingga masyarakat lebih memilih herbal untuk mengobati penyakit gangguan metabolik. Hasil penelitian Limantara (2009) menunjukkan bahwa molekul klorofil memiliki fitol yang bersifat hidrofobik atau tidak larut dalam air sehingga efektif mengikat lemak di dalam tubuh dan mengeluarkannya melalui sistem ekskresi, sehingga penyumbatan yang disebabkan oleh lemak dalam pembuluh darah dapat dihindari.

Penelitian Parman dan Harnina (2008) juga telah membuktikan bahwa tanaman alfalfa memiliki kandungan protein yang tinggi dan klorofilnya

empat kali tanaman sayur lainnya. Saponin yang merupakan salah satu kandungan bioaktif dari tanaman alfalfa dikatakan dapat mencegah peningkatan kolesterol dalam darah dan menurunkan penyerapan kolesterol ke dalam usus (Davidson, 2009). Hasil penelitian Shi *et al.*, (2014), menunjukkan bahwa saponin dari tanaman alfalfa dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah pada tikus. Senyawa fenolik yang juga merupakan salah satu kandungan bioaktif tanaman alfalfa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam memberikan atom hidrogen secara cepat kepada radikal lipid (Septiana, 2007). Mekanisme kerja flavonoid adalah menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai *scavengers* (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif (O_2) maupun radikal hidroksil (OH). Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan (Pribadi, 2010). Kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida yang menurun serta kadar HDL yang meningkat berhubungan dengan penurunan kadar MDA (Ratnayanti, 2011)

Berdasarkan latar belakang di atas, penelitian ini dilakukan untuk melihat pengaruh pemberian klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet hiperkolesterol ditinjau dari kadar HDL dan MDA.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas dapat diambil perumusan masalah antara lain:

1. Apakah terapi klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) dapat meningkatkan kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol?
2. Apakah pemberian klorofil dari tanaman Alfalfa (*Madicago sativa*) dapat menurunkan kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dibatasi pada :

1. Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan usia 8 - 12 minggu dengan berat badan 160-200 gam, diperoleh dari d' Wistar, Bandung. Penggunaan hewan coba dalam penelitian ini telah mendapatkan persetujuan Laik Etik oleh Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya nomor 323-KEP-UB (Lampiran 12)
2. Pembuatan keadaan hiperkolesterol pada hewan model tikus dilakukan dengan cara pemberian pakan tinggi kolesterol berupa campuran pakan dengan total kadar lemak 26,54% yang dibuat dalam bentuk pelet dan diberikan selama 14 hari sebanyak 10%

dari berat badan (Vanessa, 2014). Pembuatan pakan dilakukan di Laboratorium Pakan Ternak, Fakultas Kedokteran Hewan-Universitas Airlangga, Surabaya (**Lampiran 2**).

3. Klorofil dari tanaman alfalfa diperoleh dari PT. K-Link Selangor Darul Ehsan, Malaysia dengan dosis 0,36 mg/200 g BB pada kelompok P3, 0,72 mg /200 g BB pada kelompok P4, dan 1,08 mg/200 g BB pada kelompok P5 yang diberikan secara sonde lambung selama 14 hari (Karimah, 2010) sebanyak 0,045 mL (P3), 0,09 mL (P4), dan 0,135 mL (P5) yang diencerkan dengan aquades hingga 1 mL (**Lampiran 4**). Kandungan saponin, fitol, dan flavonoid dalam klorofil alfalfa telah diuji LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometry*) di Laboratorium Kimia Dasar Fakultas Teknik Kimia, Politeknik-Malang (**Lampiran 5**).
4. Variabel yang diamati dalam penelitian ini yaitu kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) yang diukur dengan metode spektrofotometri menggunakan alat *Biosystem* tipe A 15 dan MDA (*Malondialdehida*) yang diukur menggunakan uji TBA (*Thiobarbituric acid reactivity test*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).

1.4 Tujuan penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Mengetahui apakah terapi klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) dapat meningkatkan kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol.
2. Mengetahui pengaruh pemberian klorofil dari tanaman Alfalfa (*Madicago sativa*) dapat menurunkan kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol.

1.5 Manfaat penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh klorofil yang diambil dari tanaman Alfalfa terhadap kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) dan kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang telah diberi diet tinggi kolesterol.
2. Penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk penggunaan klorofil sebagai alternatif untuk meningkatkan kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) dan menurunkan kadar MDA (*Malondialdehida*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol.
3. Peneitian ini dapat menambah nilai guna tanaman alfalfa sebagai penghasil klorofil yang dapat diaplikasikan sebagai penurun kadar kolesterol dalam darah.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hiperkolesterol

2.1.1 Pengertian Hiperkolesterol

Hiperkolesterol adalah suatu keadaan tingginya kadar kolesterol dalam darah melebihi batas normal (Murray *et al.*, 2003). Kolesterol terdapat pada dinding dan membran setiap sel, termasuk sel otak, saraf, otot, kulit, hati, usus dan jantung. Kadar kolesterol normal pada manusia 120-240 mg/dL dan *pet animal* seperti anjing 150-300 mg/dL, dan pada tikus putih 40-130 mg/dL (Murray *et al.*, 2003; Bauer, 2004).

Tinggi kolesterol dapat disebabkan oleh faktor primer dan faktor sekunder. Faktor primer disebabkan oleh faktor genetik atau faktor familial yang terjadi karena adanya mutasi pada gen reseptor LDL sehingga terjadi perubahan struktur maupun fungsi dari reseptor yang mengikat *Low Density Lipoprotein* (LDL) plasma (Goldstein *et al.*, 2001). Faktor sekunder tinggi kolesterol dapat disebabkan oleh diet yang tidak seimbang. Diet yang dapat memicu hiperkolesterol salah satunya diet hiperkolesterol. Faktor lain yang dapat mempengaruhi tinggi kolesterol adalah umur, jenis kelamin, stress, alkohol dan obesitas (Ghani *et al.*, 2013).

2.1.2 Patogenesis Hiperkolesterol

Lipid yang berasal dari makanan akan mengalami proses pencernaan di dalam usus menjadi asam lemak bebas, trigliserida, fosfolipid

dan kolesterol yang akan diabsorpsi dan ditransportasikan oleh darah ke berbagai jaringan dalam bentuk lipoprotein. Lipoprotein merupakan alat pengangkut lipid dalam darah karena lipid tidak dapat larut dalam darah sehingga harus berikatan dengan protein untuk membentuk senyawa larut. Terdapat empat kelompok utama lipoprotein, yaitu: kilomikron, *very low density lipoprotein* (VLDL), *low density lipoprotein* (LDL) dan *high density lipoprotein* (HDL). Kilomikron merupakan lipoprotein yang mengangkut lipid dari penyerapan dalam usus; VLDL mengangkut trigliserol dari hati; LDL menyalurkan kolesterol ke jaringan, dan HDL membawa kolesterol dari jaringan dan mengembalikannya ke hati untuk diekskresikan dalam proses yang dikenal sebagai transpor kolesterol terbalik (*reverse cholesterol transport*). Terdapat dua mekanisme dalam transport kolesterol, yaitu transport endogen dan eksogen (Murrar *et al.*, 2003).

Transport endogen dimulai dari lipid yang dibiosintesis dalam hati dirakit dalam bentuk VLDL dan dibawa oleh aliran darah. Dalam aliran darah, trigliserida dalam VLDL akan terhidrolisis oleh *lipoprotein lipase* (LPL) menghasilkan asam lemak dan gliserol. Asam lemak berdifusi memasuki jaringan, sedangkan gliserol dan sebagian kecil asam lemak terus beredar bersama darah. Hidrolisis mengakibatkan jumlah VLDL semakin menyusut dan menjadi IDL yang kemudian mengalami hidrolisis lebih lanjut sehingga trigliserolnya semakin berkurang yang akhirnya menjadi LDL (Mayes *et al.*, 2003).

Proses transport eksogen dimulai dari trigliserida, kolesterol ester, fosfolipid dan kolesterol yang diserap dalam usus akan dirakit menjadi kilomikron dan masuk ke dalam sistem sirkulasi. Kilomikron akan dibawa ke hati melalui *vena porta hepatica* dan akan terhidrolisis membentuk VLDL yang kemudian dibawa sistem sirkulasi menuju jaringan. Pada pembuluh darah, trigliserida dalam VLDL dihirolisis oleh LPL yang akan menghasilkan asam lemak dan gliserol. Sisa VLDL biasa disebut IDL dan akan mengalami hidrolisis lebih lanjut hingga menjadi LDL (Mayes *el al.*, 2003). LDL merupakan lipoprotein yang kaya akan kolesterol dan berperan dalam pengangkutan kolesterol ke jaringan perifer (lemak jahat) (Masitahari, 2011).

Pada hewan coba hiperkolesterol, jumlah sisa LDL dalam darah akan dibawa kembali menuju hepar untuk disintesa menjadi asam empedu. Tingginya intake kolesterol menyebabkan terdapat banyak sisa kolesterol dalam LDL. Sisa kolesterol yang terlalu berlebih tidak mampu dibawa kembali ke hepar oleh HDL. Apabila terpapar oleh radikal bebas maka LDL akan teroksidasi dan memicu respon inflamasi. Respon inflamasi terlihat dari adanya aktivitas sel endotel, leukosit dan monosit. Leukosit akan muncul di sepanjang lumen dan dinding pembuluh darah sehingga meningkatkan permeabilitas pembuluh darah (Lowery, 2005).

2.1.3 Hubungan Hiperkolesterol Terhadap Kadar *HDL* (*High Density Lipoprotein*)

Lipoprotein HDL (high density lipoprotein) merupakan lipoprotein yang berfungsi dalam transpor lipid dalam darah, terutama kolesterol,

kolesterol ester dan trigliserol dan merupakan partikel terkecil dari lipoprotein, yang biasa disebut dengan kolesterol baik (Beauchesne, 2003). Lipoprotein HDL adalah lipoprotein yang mempunyai kepadatan yang tinggi. Densitas lipoprotein akan meningkat apabila kadar proteinnya naik dan kadar lemaknya berkurang. Lipoprotein HDL disintesis dan disekresi oleh hati dan usus yang selanjutnya HDL digunakan sebagai pengangkut kolesterol dalam darah dari jaringan tubuh ke hati. Lipoprotein HDL mengandung lebih banyak trigliserida dan protein dibandingkan dengan lipoprotein LDL yang banyak mengandung kolesterol dan lemak (Dorfman, 2004).

2.2 Hubungan Hiperkolesterol Terhadap Kadar MDA (Malondialdehida)

Hiperkolesterol adalah suatu keadaan yang terjadi peningkatan pada kadar kolesterol melebihi batas normal dalam darah. Tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Peningkatan sintesis asam empedu menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingan dan berikatan dengan lipid (Evans dan Cooke, 2006). Peningkatan radikal bebas menstimulasi proses peroksidasi lipid dan mengakibatkan stres oksidatif yang dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu malondialdehida (MDA) (Valko *et al.*, 2006). Proses pembentukan peroksidasi lipid dimulai dari ion hidrogen pada rantai samping (Polyunsaturated Fatty Acid atau PUFA) penyusun membran sel oleh radikal bebas, membentuk radikal karbon. Radikal karbon akan teroksidasi membentuk radikal peroksil. Selanjutnya radikal peroksil akan

menarik lagi ion H^+ pada rantai samping PUFA yang berdekatan dan membentuk peroksidasi lipid. Proses ini merupakan reaksi berantai, karena peroksidasi lipid akan menarik lagi ion H^+ pada rantai samping PUFA yang lain, sampai akhirnya rantai PUFA terputus menjadi senyawa-senyawa lain seperti hidrokarbon, 5-hidroksinonenal dan senyawa-senyawa aldehid. Hasil akhir peroksidasi lipid adalah terbentuknya MDA. Kadar MDA tinggi mengindikasikan adanya proses oksidasi atau kerusakan membran sel akibat radikal bebas (Pribadi dan Dwi, 2010).

Radikal bebas menyebabkan peradangan pada jaringan hidup yang memiliki vaskularisasi (Bastard *et al.*, 2006). Malondialdehyde (MDA) merupakan salah satu produk hasil peroksidasi asam lemak tidak jenuh. Perbedaan nilai MDA terkait dengan reaksi oksidasi yang terjadi. Kadar MDA berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Kadar MDA yang tinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang rendah begitu juga sebaliknya (Septiana, 2007). Penurunan kadar kolesterol total, LDL, dan trigliserida serta kadar HDL yang meningkat berhubungan dengan penurunan kadar MDA (Ratnayanti, 2011).

2.3 Hewan Model Tikus (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterol

Hewan model hiperkolesterol merupakan hewan coba yang memiliki kadar kolesterol darah melebihi batas normalnya (Murray *et al.*, 2003). Penggunaan tikus (*Rattus norvegicus*) sebagai hewan model tinggi kolesterol secara konvensional sudah banyak digunakan antara lain seperti yang

dilakukan Nofendri (2004) dengan cara induksi endogen melalui pemberian propiltiourasil (PTU) yang mampu meningkatkan konsentrasi kolesterol darah dengan merusak kelenjar tiroid sehingga terjadi peningkatan konsentrasi LDL plasma akibat gangguan metabolisme LDL dan induksi eksogen dapat dilakukan melalui konsumsi pakan tinggi kolesterol dan asam lemak jenuh. Pada tikus putih kadar normal kolesterol 100-140 mg/dL.

Menurut Sirois (2005) menyatakan bahwa tikus (*Rattus norvegicus*) banyak digunakan sebagai hewan coba karena mudah dipelihara dan merupakan hewan yang relatif sehat dan cocok untuk berbagai penelitian. Ciri-ciri morfologi tikus (*Rattus norvegicus*) antara lain memiliki kepala besar, ekor yang pendek, memiliki berat 150-200 gram, panjang tubuh 18-25 cm, kepala dan telinga berukuran 20-23 mm (Gambar 2.1). Taksonomi tikus (*Rattus norvegicus*) menurut Sirois (2005) adalah:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Sub famili	: Murinae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>
Gallur	: Wistar



Gambar 2.1. Tikus Putih (Sirois, 2005)

Morfologi pada tikus putih yaitu bertubuh panjang dengan kepala lebih sempit, memiliki telinga yang tebal dan pendek dengan rambut halus. Mata berwarna merah muda, ciri yang paling terlihat adalah ekornya yang panjang. Berat badan tikus jantan yang berumur 12 minggu mencapai 240 gam, sedangkan berat badan tikus betina mencapai 200 gam (Sirois, 2005).

Tikus putih digunakan dalam penelitian ini karena tikus putih memiliki evolusi yang rendah. Oleh karena itu, pada saat penelitian tikus putih tidak berubah dalam perkembangan hidupnya sehingga lebih mudah dipantau dengan kondisi yang tetap atau hampir sama. Metabolisme tikus putih mirip dengan metabolisme pada anjing dan kucing sehingga tikus putih dapat dijadikan objek penelitian yang dapat diaplikasikan pada hewan tersebut (Rahayu, 2007).

2.4 Alfalfa

2.4.1 Klasifikasi Tanaman Alfalfa

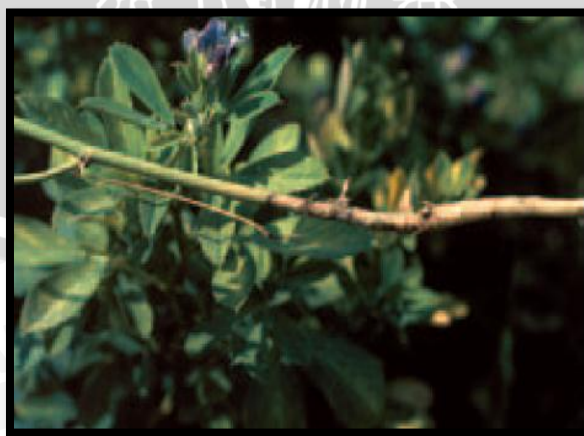
Menurut Sirait dkk. (2010), alfalfa diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)

Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Rosidae
Ordo	: Fabales
Famili	: Fabaceae (suku polong-polongan)
Tribe	: Trifolieae
Genus	: <i>Medicago</i>
Spesies	: <i>Medicago sativa</i> L.

Alfalfa (*Medicago sativa* L) termasuk tanaman leguminosa perenial yang berkembang secara luas sebagai pakan ternak. Pertumbuhan akar yang dalam dapat mencapai 4,5 meter sehingga tanaman tangguh menghadapi musim kering atau kekeringan yang panjang (Gambar 2.2). Batang tanaman tumbuh mendatar, berkayu di bagian dasar, cabang-cabang dan menanjak sampai tegak setinggi 30 – 120 cm. Daun satu tangkai (petiol) berdaun tiga (trifoliat), panjang 5 – 15 mm, berbulu pada permukaan bawah, tangkai daun berbulu, bunga berbentuk tandan yang rapat berisi 10 – 35 bunga, mahkota bunga berwarna ungu atau biru jarang yang berwarna putih (Undersander *et al.*, 2013).



Gambar 2.2. Tanaman Alfalfa (Undersander *et al.*, 2013)

2.4.2 Kandungan Bioaktif Tanaman Alfalfa

Menurut Caunii *et al.*, (2012), kandungan bioaktif dalam alfalfa yaitu pati, karbohidrat, protein (histones, L-lysine, L-arginine, aspartic dan asam glutamat), asam amino non-protein (L-canaverine), tanin, pectin, saponin, amine, derivat coumarine, triterpene glucoside, karoten, basa purin, sterol, fitoestrogen (cumestrol), flavon, isoflavon, senyawa fenol, vitamin (A, D, E, K, B6, U, C), enzim, dan mineral (kalsium, magnesium, zat besi, zinc, fosfor, potassium).

Dengan kandungan kimia tersebut, alfalfa memiliki khasiat yang sangat baik bagi tubuh. Efek farmakologis alfalfa bagi tubuh diantaranya antianemia, antiinflamasi, antiparasit, antioksidan, analgetika, detoks, diuretik, pelancar ASI, pencahar, probiotik (pembangkit selera makan), mempercepat penyerapan gizi, regulator pH darah dan tonikum. Selain itu, tanaman Alfalfa juga kaya dengan klorofil yang mengandung saponin. Saponin dikatakan dapat mencegah kenaikan kolesterol dalam darah dan menurunkan penyerapan kolesterol ke dalam usus. Saponin berikatan dengan asam empedu, di mana asam empedu mempunyai peran sebagai transpor bagi kolesterol bebas dan molekul fosfolipid yang sudah dicerna (Davidson, 2009).

Salah satu kelebihan alfalfa adalah kandungan klorofilnya yang tinggi. Alfalfa merupakan sumber klorofil tertinggi dibandingkan dengan sumber klorofil lain seperti chlorela, barley, dan spirulina. Sumber makanan tersebut sering disebut dengan *green food* (Caunii *et al.*, 2012).

The image displays two chemical structures side-by-side. On the left is the structure of haemoglobin, showing a central iron atom (Fe) coordinated by four nitrogen atoms in a porphyrin-like ring. The ring is substituted with methyl groups (CH₃) and vinyl groups (CH=CH₂). Two propionate side chains are shown as -CH₂-CH₂-COOH. On the right is the structure of chlorophyll a, showing a central magnesium atom (Mg) coordinated by four nitrogen atoms in a similar ring. It features a phytyl ester side chain (labeled 'Fityl' and 'hydrophobic') and a formyl group (CHO, labeled 'hydrophilic'). Below each structure is its name in Indonesian: 'Struktur kimia haemoglobin' and 'Struktur kimia klorofil'. A legend specifies R=CH₃ for Klorofil a and R=CHO for Klorofil b.

Struktur kimia haemoglobin

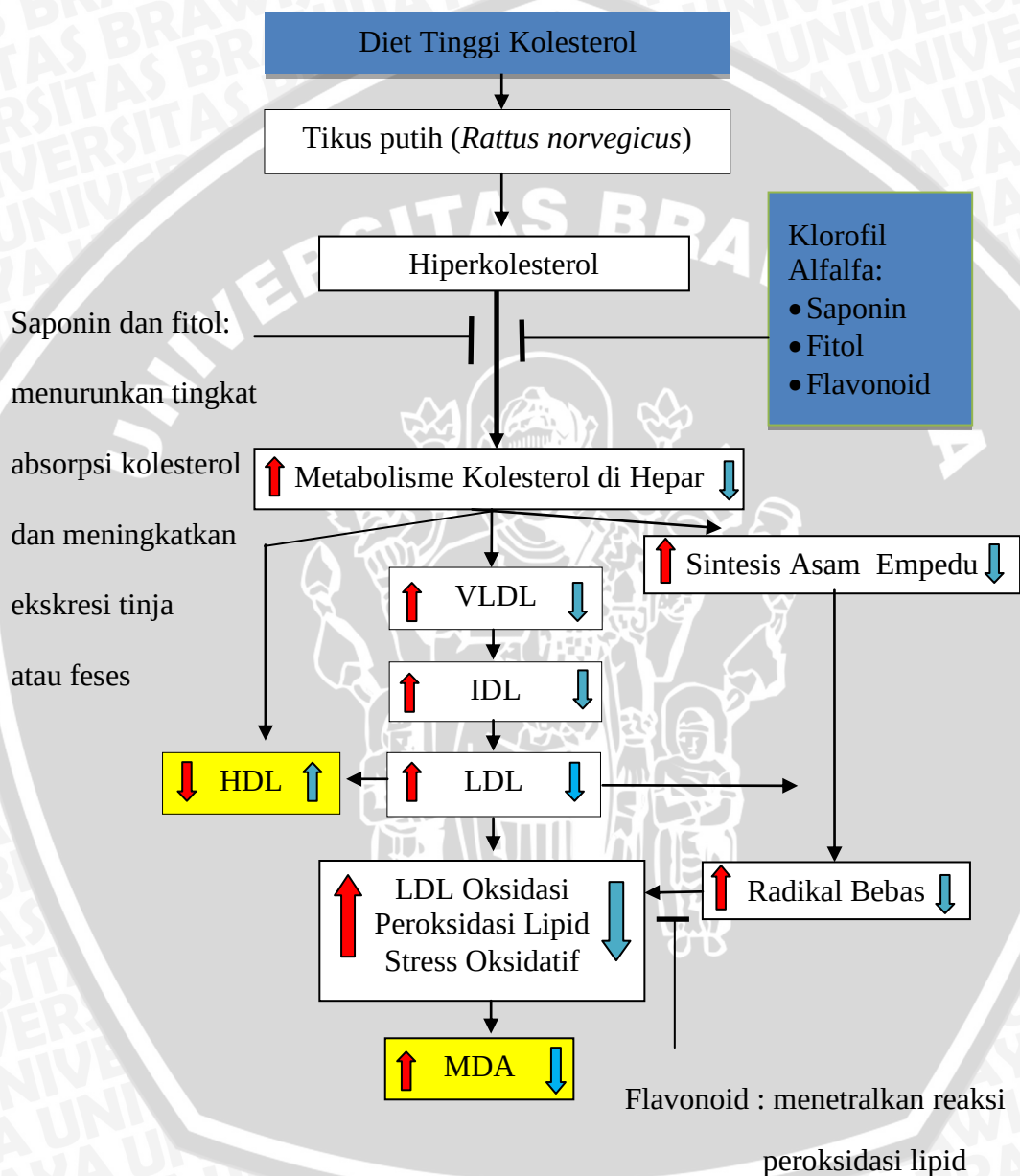
Struktur kimia klorofil

Klorofil a (R=CH₃) Klorofil b (R=CHO)

Molekul klorofil tersusun atas 4 cincin pirol dengan Mg sebagai inti. Pada klorofil terdapat rangkaian yang disebut fitil ($C_{20}H_{39}O$) yang jika terkena air dengan pengaruh enzim klorofilase akan berubah menjadi fitol ($C_{20}H_{39}O$). Fitol adalah alkohol primer jenuh yang mempunyai daya afinitas yang kuat terhadap O_2 dalam proses reduksi klorofil (Suyitno, 2008)

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan:

-  : Efek pemberian diet hiperkolesterol
  : Variabel Tergantung
-  : Efek pemberian klorofil
  : Menstimulus
-  : Variabel bebas
  : Menghambat

Hiperkolestrolemia adalah suatu penyakit gangguan metabolisme kolesterol yang disebabkan oleh tingginya kadar kolesterol dalam darah. *Intake* kolesterol melalui pakan akan diserap di dalam usus dibawa ke jaringan ekstra hepatic untuk dihidrolisis yang selanjutnya dibawa ke hepar. Kilomikron sebagai transport lipid yang masuk ke hati disintesa menjadi *High Density Lipoprotein* (HDL) dan *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL), selanjutnya VLDL diubah menjadi IDL dan kemudian *Low Density Lipoprotein* (LDL). Pakan tinggi kolesterol mengakibatkan metabolisme kolesterol menjadi terganggu. Kadar kolesterol yang tinggi dalam darah menyebabkan VLDL menghasilkan banyak LDL sehingga LDL dalam darah meningkat. Kadar LDL yang terus meningkat membuat HDL tertekan dan tidak bisa membuang kelebihan kolesterol yang ada dalam darah, sehingga kadar HDL menurun.

Tubuh pada kondisi hiperkolesterol yang ditandai dengan peningkatan kolesterol total terutama LDL akan menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu yang mekanismenya terjadi dihati. Peningkatan sintesis asam empedu di hati menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingannya. Semakin banyak asam empedu yang disintesis, semakin banyak oksigen yang diperlukan, sehingga radikal bebas

terbentuk secara berlebihan. Kadar HDL yang terus menurun mengakibatkan peningkatan kadar LDL dan radikal bebas yang memicu terjadinya LDL Oksidasi. Peningkatan radikal bebas menstimulasi proses peroksidasi lipid dan mengakibatkan stres oksidatif yang dapat ditentukan dengan mengukur salah satu parameter yaitu *malondialdehida* (MDA) (Valko *et al.*, 2006). Proses dimulai dari ion hidrogen pada rantai samping (Polyunsaturated Fatty Acid atau PUFA) sebagai penyusun membran sel oleh radikal bebas, kemudian dibentuk menjadi radikal karbon. Radikal karbon akan teroksidasi membentuk radikal peroksil. Selanjutnya radikal peroksil akan menarik lagi ion H^+ pada rantai samping PUFA yang berdekatan dan membentuk peroksidasi lipid. Proses ini merupakan reaksi berantai, karena peroksidasi lipid akan menarik lagi ion H^+ pada rantai samping PUFA yang lain, sampai akhirnya rantai PUFA terputus menjadi senyawa-senyawa lain seperti hidrokarbon, 5-hidroksinonenal dan senyawa-senyawa aldehyd. Hasil akhir peroksidasi lipid adalah terbentuknya MDA (Pribadi dan Dwi, 2010).

Salah satu upaya yang diperlukan untuk terapi tinggi kolesterol adalah mengurangi kadar kolesterol dalam darah dan peran antioksidan dalam menekan terjadinya oksidasi LDL, LDL, dan kadar HDL yang meningkat berhubungan dengan penurunan kadar MDA (Widowati *et al.*, 2013). Klorofil tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) memiliki kandungan senyawa aktif saponin, fitol, senyawa fenolik serta flavonoid yang dapat mengurangi kadar kolesterol dalam darah. Saponin yang merupakan fito-kimia, yang tercatat dapat mengikat dan mencegah penyerapan kolesterol dengan cara berikatan

dengan asam empedu. Asam empedu mempunyai peran sebagai transpor bagi kolesterol bebas dan molekul fosfolipid yang sudah dicerna (Davidson, 2009). Menurut Shi *et al.*, (2014) saponin dari tanaman alfalfa diketahui dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah pada tikus, sedangkan fitol yang bersifat hidrofobik atau tidak larut dalam air efektif mengikat lemak di dalam tubuh dan mengeluarkannya melalui sistem ekskresi, sehingga lemak yang dapat menyebabkan penyumbatan pembuluh darah dapat dihindari. Kandungan aktif Senyawa saponin, fenol dan flavonoid dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar MDA dengan mengurangi sekresi kolesterol sehingga membuat HDL dapat membawa kolesterol untuk di sintesis kembali di dalam hati. Sintesis radikal bebas yang berlebihan menstimuli pembentukan peroksidasi lipid. Mekanisme kerja flavonoid dapat menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai *scavengers* (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif (O_2) maupun radikal hidroksil (OH). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal flavonoid dan akan bereaksi dengan oksigen reaktif (superoksida) sehingga menjadi netral. Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pemberian klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol dapat meningkatkan kadar HDL
2. Pemberian klorofil dari tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet tinggi kolesterol dapat menurunkan kadar MDA.



BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2014 sampai Maret 2015.

Penelitian dibagi menjadi dua tahap, yaitu tahap perlakuan dan tahap pemeriksaan. Tahap perlakuan bertempat di Laboratorium Biosains Universitas Brawijaya, sedangkan tahap pemeriksaan bertempat di Rumah Sakit Islam Malang.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.3.1 Alat

Peralatan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain: kandang individual, *beaker glass*, penangas air, corong, timbangan digital, *sput*, *microtube*, kandang tikus putih, botol minum tikus putih, tempat makan tikus putih, sentrifuse, tabung *pediatric*, *spectofotometer*, penjepit (*block holder*), *scalpel*, gunting, pinset, sarung tangan, inkubator, gelas objek.

4.3.2 Bahan

Pakan standar (untuk aklimatisasi), pakan normal, air minum, diet tinggi kolesterol, dan klorofil tanaman alfalfa (*Medicago sativa L*).

a. Bahan Pakan

Penelitian ini terdapat dua macam pakan tikus putih yaitu pakan diet normal dan pakan diet hiperkolesterol. Komposisi pakan kontrol dan pakan hiperkolesterol dapat dilihat pada gambar tabel 4.2 :

Tabel 4.2 : Komposisi pakan kontrol dan pakan hiperkolesterol

Bahan	Pakan Kontrol	Pakan Hiperkolesterol
Tepung ikan	23%	30%
Kedelai	6%	4%
Dedak padi	10%	0%
Karak	31,5%	30%
Jagung	20%	2%
Tepung Terigu	5%	0%
Mineral	2%	2,5%
Lemak	0%	26,54%
Tetes	2%	3%
Multivitamin	0,5%	0,5%
TOTAL	100 %	100%

b. Bahan Pemeriksaan HDL

Bahan yang dipergunakan dalam pemeriksaan kadar HDL dengan dibutuhkan kit pengukur kolesterol HDL *reader* tipe A15 dengan merk *BioSystem*.

c. Bahan Pemeriksaan MDA

Bahan yang dipergunakan dalam Pengukuran Kadar (MDA) pada tikus putih, antara lain NaCl 0,9%, 550 μ L akuades, 100 μ L TCA, 250 μ L HCl 1N, dan 100 μ L Na-Thio.

4.3 Populasi Hewan Coba

4.3.1 Sampel Penelitian dan Pengulangan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Desain penelitian yang digunakan adalah *Post Test Control Goup Design*. Desain ini subjek ditempatkan secara acak ke dalam kelompok-kelompok dan ditunjukkan sebagai variabel independen yang diberi post test. Nilai-nilai post test kemudian dibandingkan untuk menentukan keefektifan *treatment*. Penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian dihitung dengan menggunakan rumus:

$$[p(n-1) \geq 15] \text{ (Kusriningum, 2008).}$$

Sehingga:

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = Jumlah perlakuan

n = Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan rumus tersebut, jika banyak perlakuan adalah 5 maka jumlah sampel yang dibutuhkan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan adalah lebih besar dari atau sama dengan 4. Jadi untuk 5 kelompok perlakuan dibutuhkan sebanyak 20 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*).

Variabel bebas : Dosis terapi klorofil dari tanaman alfalfa dan pemberian pakan diet tinggi kolesterol

Variabel tergantung : Kadar HDL dan Pengukuran Kadar

Malondialdehida (MDA) serum

Variabel kontrol : Jenis hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan dengan berat badan 160-200 gam, usia 8-12 minggu dan berada dalam kondisi sehat; kondisi lingkungan kandang; suhu; dan air minum.

4.4 Tahapan Penelitian

1. Preparasi hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pembuatan pakan hiperkolesterol.
3. Persiapan hewan model hiperkolesterol.
4. Penyediaan klorofil tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.).
5. Pengukuran kadar kolesterol total sebelum terapi
6. Penentuan dosis klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*).
7. Terapi klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*).
8. Pengambilan serum darah tikus putih (*Rattus norvegicus*).
9. Pengukuran kadar HDL dengan diukur menggunakan alat Biosystem tipe A 15.
10. Pengukuran kadar *Malondialdehida* (MDA) dengan metode uji TBA (*Thiobarbituric acid reactivity test*).
11. Analisa data

4.5 Prosedur Kerja

4.5.1 Preparasi Hewan Coba Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba yaitu kandang individu dengan luas 700 cm³/hewan, sekam, botol minum, alat semprot, tempat makan, alkohol 70%, hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dan seleksi berdasarkan usia, jenis kelamin, berat badan, dan kesehatan. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan selama 7 hari dan dibagi dalam 5 kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*). Selama adaptasi, tikus putih (*Rattus norvegicus*) diberi pakan standar (normal).

Tabel 4.5 : Rancangan Kelompok Perlakuan

Kelompok	Keterangan
P1 (Kontrol Negatif)	Kontrol negatif. Tikus putih hanya diberi pakan normal peroral dan minum <i>ad libitum</i>
P2 (Kontrol Positif)	Tikus putih diberi pakan hiperkolesterol peroral
P3 (Terapi 1)	Tikus hiperkolesterol diterapi klorofil tanaman alfalfa dosis 0,36 mg/200 g BB yang diberikan melalui sonde lambung selama 14 hari.
P4 (Terapi 2)	Tikus hiperkolesterol diterapi klorofil tanaman alfalfa dosis 0,72 mg/200 g BB yang diberikan melalui sonde lambung selama 14 hari.
P5 (Terapi 3)	Tikus hiperkolesterol diterapi klorofil tanaman alfalfa (<i>Medicago sativa</i>) dosis 1,08 mg/200 g BB yang diberikan melalui sonde lambung selama 14 hari.

4.5.2 Pembuatan Pakan Hiperkolesterol

Pakan tinggi kolesterol adalah pakan yang sengaja dibuat untuk meningkatkan konsentrasi kolesterol darah hewan coba (Hardiningsih dkk, 2006). Bahan pakan yang dipakai terdiri dari tepung ikan, kedelai, dedak

padi, karak, jagung, tepung terigu, mineral, lemak, tetes, dan multivitamin (Hernawati dkk, 2013). Komposisi pakan hiperkolesterol ini dimodifikasi dengan penambahan lemak babi sampai prosentase 28% dari jumlah total pakan. Pembuatan pakan hiperkolesterol dilakukan dengan cara penimbangan bahan sesuai dengan komposisi yang telah dibuat. Selanjutnya seluruh bahan dicampur dan diaduk sampai homogen. Bahan kering yang telah dicampur kemudian dimasukkan kedalam mesin *mixing*. Pengadukan bahan dengan mesin *mixing* perlu ditambah air secukupnya untuk mempermudah pencampuran adonan. Campuran yang telah homogen tersebut kemudian dicetak menggunakan mesin pres untuk membentuk adonan seperti pelet. Komposisi pakan hiperkolesterol dapat dilihat pada **Lampiran 2**. Setelah adonan dalam bentuk pelet terbentuk, dilakukan penimbangan pakan untuk per ekor tikus yang disesuaikan dengan berat badan tikus (Murwani dkk, 2006).

4.5.3 Persiapan Hewan Coba Hiperkolesterol

Hewan coba hiperkolesterol disiapkan dengan menggunakan metode Hernawati dkk (2013). Sebelum dilakukan perlakuan, hewan coba diadaptasi di laboratorium selama tujuh hari dengan pemberian pakan standart dan minum *ad libitum*. Tikus kemudian dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan yang masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor. Pada hari ke-1 dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol pada kelompok perlakuan P1, P2, P3, P4, dan P5 untuk memastikan hewan coba tidak mengalami

hiperkolesterol sebelum dilakukan induksi hiperkolesterol. Induksi diet hiperkolesterol dilakukan pada hari ke-7 dengan menggunakan pakan hiperkolesterol yang diberikan pada kelompok perlakuan P1, P2, P3 dan P4. Induksi diet tinggi kolesterol berupa campuran pakan dengan komposisi: tepung ikan, kedelai, dedak padi, karak, jagung, tepung terigu, mineral, lemak, tetes, dan multivitamin yang dibuat dalam bentuk pelet dan diberikan selama 14 hari (Razak, 2007). Diet hiperkolesterol dibuat pakan tersebut mengandung kadar lemak sebesar 26,54% (**Lampiran 3**). Hewan tinggi kolesterol dibuat dengan pemberian diet hiperkolesterol yang diberikan secara per-oral sebanyak 10% dari berat badan/hari selama 14 hari (Vanessa dkk, 2014). Diet hiperkolesterol diberikan pada kelompok 1-4, sedangkan tikus pada kelompok 5 diberikan pakan normal dengan kadar lemak sebesar 4,42% (**Lampiran 3**). Tikus diukur kadar kolesterol totalnya setelah diberikan diet hiperkolesterol selama 14 hari untuk memastikan bahwa tikus telah mengalami tinggi kolesterol. Tikus dikatakan mengalami tinggi kolesterol jika kadar kolesterol totalnya melebihi batas normal (>200 mg/dL).

4.5.4 Penyediaan Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Klorofil yang digunakan adalah dalam bentuk liquid, diperoleh dari PT. K-Link Selangor Darul Ehsan Malaysia. Cairan klorofil ini diambil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*).

4.5.5. Pengukuran Kadar kolesterol Total Sebelum Terapi

Pengukuran kadar kolesterol total dilakukan sebelum terapi pada tikus yang sudah diberi pakan hiperkolesterol selama 2 minggu. Pengukuran dilakukan setiap 2 minggu sebelum dan sesudah pemberian pakan tinggi kolesterol. Metode pengambilan darah untuk pengukuran kadar kolesterol total diambil melalui *vena coccygea* menggunakan *sprit terumo* 5cc/mL dengan ukuran jarum (0,70 x 38 mm) yang dilakukan sebelum dan setelah perlakuan pemberian diet tinggi kolesterol.

Pengukuran kadar kolesterol total menggunakan alat *easy touch* yang bertujuan untuk mengetahui apakah kadar kolesterol total tikus sudah mencapai >200 mg/dL. Alat ini merupakan perangkat terbaru dengan tenaga baterai yang dapat mengukur kadar kolesterol total dengan mengubah chipnya pengecekannya. Alat multi fungsi bisa digunakan untuk pemeriksaan gula darah, pemeriksaan asam urat dan kadar kolesterol sekaligus dalam satu alat. Penggunaannya dengan mengganti chipnya sesuai dengan yang dibutuhkan. Berikut Kadar kolesterol total tikus sebelum dan setelah pemberian pakan tinggi kolesterol menggunakan alat *easy touch* :

Tabel 4.6.1. Hasil Analisa Kadar Kolesterol Total Sebelum Pemberian Pakan Hiperkolesterol menggunakan *easy touch*

Kelompok Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
P1 (Kontrol Negatif)	56	59	45	53
P2 (Kontrol Hiperkolesterol)	54	65	63	45
P3	75	67	55	64
P4	63	51	69	77
P5	55	66	61	73

Tabel 4.6.2. Hasil Analisa Kadar Kolesterol Total Sesudah Pemberian Pakan Hiperkolesterol menggunakan *easy touch*

Kelompok Perlakuan	Ulangan			
	1	2	3	4
P1 (Kontrol Negatif)	57	60	63	55
P2 (Kontrol Hiperkolesterol)	201	225	207	231
P3	209	203	217	236
P4	228	214	205	238
P5	222	206	234	201

4.5.6 Penentuan Dosis Klorofil dari Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*)

Dosis klorofil yang diberikan untuk tujuan pengobatan adalah 100 – 300 mg/kg BB/hari (Karimah, 2010). Menurut tabel konversi dosis, menyebutkan bahwa faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat 200 g adalah 0,018. Konsentrasi klorofil yang digunakan adalah 8 mg/ml. Perhitungan dosis dapat dilihat pada lampiran 4.

Maka dosis yang digunakan 0,36 mg/200 g BB pada kelompok P3, 0,72 mg /200 g BB pada kelompok P4, dan 1,08 mg/200 g BB pada kelompok P5 yang diberikan secara sonde lambung selama 14 hari sebanyak 0,045 mL (P3), 0,09 mL (P4), dan 0,135 mL (P5) yang diencerkan dengan aquades hingga 1 mL.

4.5.7 Terapi Klorofil Dari Tanaman Alfalfa (*Medicago Sativa*).

Terapi klorofil tanaman alfalfa dilakukan melalui pemberian oral sesuai dengan dosis terapi masing-masing kelompok selama 14 hari. Menurut Permatasari (2012), pemberian oral dilakukan secara sonde

lambung. Tikus dipegang pada bagian tengkuk dan ekor dijepit menggunakan jari manis dan jari kelingking. Ujung sonde dimasukkan sampai organ lambung dan diberikan bahan terapi.

4.5.8 Pengambilan Serum Darah Tikus Putih Tikus Putih (*Rattus norvegicus*).

4.5.8.1 Pengambilan Sampel Serum

Metode pengambilan darah untuk pengukuran kadar HDL dan MDA *post examination* diambil melalui jantung dengan cara pembedahan. Sebelum dibedah, tikus dieuthanasi terlebih dahulu dengan metode *cervical dislocation*. Tikus diposisikan *dorsal recumbency* yang kemudian Ekstremitas difiksasi dengan jarum lalu disayat bagian ruang peritoneum dibuka dengan insisi pada abdomen. Ruang dada dibuka dengan memotong tulang rusuk pada bagian sternum dan diambil darah pada jantung dengan menusukkan spuit di bagian ventrikel sinister. Sampel darah dimasukkan ke dalam tabung reaksi tanpa antikoagulan untuk mendapatkan serumnya. Darah ditampung dalam *microtube* diletakkan posisi miring 45° dan dibiarkan mengendap selama $\pm 3,5$ jam, kemudian darah disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Supernatan dikoleksi sebagai serum, disimpan pada suhu -20°C lalu dilakukan pemeriksaan kadar HDL dan MDA.

4.5.9 Pengukuran Kadar HDL dengan Metode Spektrofotometri.

Pengukuran kadar HDL dilakukan dengan metode spektrofotometri yang dimulai dari pembuatan reagen A dan reagen B, pencampuran reagen dengan serum dan pengukuran absorbansi. Pengukuran nilai absorbansi HDL serum darah dilakukan secara otomatis dengan alat *Biosystem tipe A 15*.

4.5.10 Pembuatan Kurva Baku *Malondialdehida (MDA)*

Pembuatan kurva standar MDA dengan konsentrasi 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 dan 8 µg/ml masing-masing diambil 100µL, dimasukkan dalam tabung reaksi yang berbeda, setelah itu ditambahkan 550 µL aquades. Masing-masing tabung yang berisi 650 µL larutan standar ditambahkan 100 µL TCA 100%, 250 µL HCl 1 N dan 100 µL Na-Thio 1 %. Dihomogenkan dengan *vortex mixer*, tabung ditutup dengan plastik dan diberi lubang. Diinkubasi dengan penangas air dengan suhu 100°C selama 30 menit kemudian didinginkan pada suhu 270C. Selanjutnya MDA dengan konsentrasi 4 µg/mL diukur absorbansinya pada range panjang gelombang 500-600 nm untuk menentukan panjang gelombang maksimum MDA, kemudian dibuat kurva standar MDA dengan dibaca absorbansinya pada variasi konsentrasi (1,2,3,4,5,6,7 dan 8 µg/ml) pada panjang gelombang maksimumnya.

4.5.10.1 Pengukuran Kadar *Malondialdehida (MDA)*

Kadar MDA diukur dari sampel darah dari jantung yang diambil pada tikus hiperkolesterol. Darah ditampung dalam tabung mikro diletakkan posisi miring 45° dan dibiarkan mengendap selama ± 3,5 jam, kemudian darah disentrifus selama 15 menit dengan kecepatan 3000 rpm.

Supernatan dikoleksi sebagai serum. Serum yang terpisah dari sel darah merah selanjutnya digunakan untuk pemeriksaan kadar MDA. Sampel diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 532 μm untuk uji TBA dan diplotkan pada kurva standar yang telah dibuat untuk menghitung konsentrasi sampel. Sebanyak 400 μL sampel direaksikan dengan 200 μL *trichloroacetic acid* (TCA) 20% untuk deproteinasi. Kemudian divorteks dan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk diambil dan ditambahkan 400 μL TBA 0,67%. Selanjutnya sampel divorteks dan diinkubasi dalam pemanas air pada suhu 96°C, 10 menit kemudian angkat dan dinginkan pada suhu ruang. Kemudian baca serapan pada panjang gelombang 530 nm (Wresdiyati dkk, 2006).

4.6 Analisis Data

Hasil penelitian berupa data kuantitatif yang diperoleh dari hasil pengukuran pada kadar HDL dan MDA. Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan *SPSS rev 20,0* menggunakan analisis ragam *one way* ANOVA dan dilakukan analisis lebih lanjut dengan uji Tukey ($\alpha= 0,05$) (Saefuddin, 2009).

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengaruh Pemberian Klorofil Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap Kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterol

Hasil penelitian dan pengukuran kadar HDL dan kolesterol terhadap pemberian terapi ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada hewan model hiperkolesterol dapat dilihat pada (Tabel 5.1 dan 5.2).

Tabel 5.1.1 Rata-rata pengukuran kadar kolesterol total sebelum dan sesudah diberikan pakan hiperkolesterol pada tikus putih menggunakan *easy touch*.

Sebelum Pemberian Pakan Hiperkolesterol						
Kelompok Perlakuan	Ulangan				Rata - rata	SD
	1	2	3	4		
P1 (Kontrol Negatif)	56	59	45	53	53,25	6.0208
P2 (Kontrol Hiperkolesterol)	54	65	63	45	56,75	9.17878
P3	75	67	55	64	65.25	8.26136
P4	63	51	69	77	65	10.9545
P5	55	66	61	73	63.75	7.63217
Sesudah Pemberian Pakan Hiperkolesterol						
P1 (Kontrol Negatif)	57	60	63	55	58.75	3.5
P2 (Kontrol Hiperkolesterol)	201	225	207	231	216	14.2829
P3	209	203	217	236	216.25	14.3614
P4	228	214	205	238	221.25	14.6373
P5	222	206	234	201	215.75	15.1079

Tabel 5.2 Rata-rata kadar HDL terhadap pemberian terapi ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada tikus putih yang diberi diet tinggi kolesterol.

Kelompok	Kadar HDL (Rata – rata mg/dL)	Peningkatan (%)	Penurunan (%)
Kontrol Negatif (P1)	118,75 ± 8,42 ^e		
Kontrol Positif (P2)	28,500 ± 3,87 ^a		316,67%
Terapi 1 (P3)	64,250 ± 5,19 ^b	125,43%	
Terapi 2 (P4)	78,500 ± 4,65 ^c	175,43%	
Terapi 3 (P5)	97,000 ± 7,07 ^d	240,35%	

Keterangan : Notasi a, b, c, d dan e menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan (Perhitungan pada **Lampiran 5**)

Hasil uji kadar HDL pada lima kelompok perlakuan menunjukkan nilai yang berbeda signifikan. Perhitungan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa terapi klorofil berbeda nyata ($P < 0,05$) terhadap peningkatan kadar HDL (**Tabel 5.2**). Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa tiga dosis terapi berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif ($P < 0,05$).

Hasil pengukuran post test HDL menunjukkan hasil pada kelompok kontrol negatif (P1) memiliki kadar HDL 118,75 ± 8,42 mg/dL. Menurut Hartoyo (2008) menyatakan bahwa kadar HDL pada tikus yang normal yaitu ≥ 35 mg/dL. Hal ini menunjukkan kadar HDL pada kelompok negatif P1 dalam batas normal. Kelompok hiperkolesterol P2 memiliki kadar HDL 28,500 ± 3,87 mg/dL dengan penurunan sebesar 316,67%. Berdasarkan hasil uji Tukey menunjukkan hasil berbeda signifikan terhadap kelompok negatif. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi kolesterol menyebabkan penurunan HDL pada kelompok perlakuan P2. Hal ini sesuai dengan penelitian Hardiningsih dan Nurhidayat (2006), yang menyatakan

bahwa pemberian pakan hiperkolesterol dapat meningkatkan konsentrasi kolesterol darah hewan coba. Penurunan kadar HDL dikarenakan adanya kolesterol berlebih oleh pemberian pakan hiperkolesterol yang menyebabkan penumpukan kolesterol dalam tubuh. Selanjutnya penumpukan kolesterol diikuti dengan aktivitas radikal bebas menyebabkan adanya kerusakan oksidatif pada beberapa jaringan. Kadar kolesterol yang tinggi dalam darah menyebabkan VLDL membentuk LDL, akibatnya LDL dalam darah meningkat. Kadar LDL yang terus meningkat membuat HDL tertekan dan tidak bisa membuang kelebihan kolesterol yang ada dalam darah, sehingga keadaan HDL menurun (Shi *et al.*, 2014).

Pemberian ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada pada kelompok perlakuan P3, P4, dan P5 dapat meningkatkan kadar HDL. Kelompok perlakuan P3 memiliki kadar HDL $64,250 \pm 5,19$ mg/dL dengan peningkatan kadar HDL sebesar 125,43% menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol hiperkolesterol dan kontrol negatif. Kelompok perlakuan P4 memiliki kadar kolesterol total $78,500 \pm 4,65475$ mg/dL dengan peningkatan kadar HDL sebesar 175,43% menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol hiperkolesterol dan kontrol negatif. Kelompok perlakuan P5 memiliki kadar kolesterol total $97,000 \pm 7,07107$ mg/dL dengan peningkatan kadar HDL sebesar 240,35% menunjukkan berbeda signifikan terhadap kontrol hiperkolesterol ($p < 0,05$) dan berbeda signifikan terhadap kontrol negatif ($p < 0,05$). Pemberian terapi pada kelompok P3, P4, dan P5 termasuk dalam standar normal kadar HDL. Hasil

analisis tersebut menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P5 merupakan dosis terbaik untuk meningkatkan kadar HDL tikus putih. Hal ini dikarenakan kadar HDL pada kelompok perlakuan P5 mendekati kadar HDL kelompok negatif dan kadar HDL pada kelompok P5 dalam batas normal. Hal ini menunjukkan bahwa terapi klorofil tanaman alfalfa mampu mengurangi kolesterol berlebih dalam darah berdasarkan peningkatan kadar HDL yang diberi pakan diet tinggi kolesterol. Terapi klorofil tanaman alfalfa mampu meningkatkan kadar HDL dikarenakan terdapat kandungan senyawa saponin dan fitol. Kandungan senyawa saponin dan fitol yang dapat meningkatkan eksresi kolesterol dan menurunkan penyerapan kolesterol di dalam usus yang berpengaruh terhadap peningkatan kadar HDL. Saponin yang diserap oleh saluran pencernaan menyebabkan kerusakan misel. Misel berfungsi membawa lipid menuju usus halus agar dapat diabsorpsi. Rusaknya misel menyebabkan penurunan penyerapan kolesterol di dalam usus halus dan meningkatkan penyerapan kolesterol langsung menuju usus besar. Akibatnya, terjadi peningkatan penyerapan kolesterol di dalam kolon yang kemudian dikeluarkan melalui sistem eksresi. Fitol bersifat hidrofobik atau tidak larut di dalam air, sehingga efektif mengikat lipid dan mengeluarkannya melalui sistem eksresi. Absorpsi kolesterol yang rendah dapat menurunkan konsentrasi kolesterol darah sehingga kadar LDL menurun. Kadar LDL yang menurun membuat HDL dapat kembali membawa kolesterol untuk di sintesis kembali di dalam hati (Shi *et al.*, 2014).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis terapi semakin besar peningkatan kadar HDL. Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan yang semakin besar pada kelompok P5 yang diberi terapi dengan dosis tertinggi (1,08 mg/200 g BB) yaitu sebesar 240,35% (**Tabel 5.1**). Kelompok terapi 3 (P5) dengan dosis 1,08 mg/200 g BB menunjukan peningkatan HDL paling maksimum, tetapi masih menunjukkan perbedaan signifikan ($P < 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P1) (**Tabel 5.1**). Hal ini menunjukkan bahwa terapi klorofil tanaman alfalfa masih perlu peningkatan dosis untuk mengetahui dosis efektif dalam meningkatkan kadar HDL pada kondisi tinggi kolesterol.

5.2 Pengaruh Pemberian Klorofil Alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap Kadar MDA (*Malondialdehida*) Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Hiperkolesterol.

Hasil penelitian pengaruh pemberian terapi ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) terhadap kadar MDA pada hewan model hiperkolesterol dapat dilihat pada (Tabel 5.3).

Tabel 5.2 Rata-rata Kadar MDA terhadap pemberian terapi ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada tikus putih yang diberi diet tinggi kolesterol.

Kelompok	Kadar MDA (Rata – rata mg/dL)	Peningkatan (%)	Penurunan (%)
Kontrol Negatif (P1)	0.0952 ± 0.05058 ^a		
Kontrol Positif (P2)	1.3664 ± 0.14472 ^d	1.335.29%	
Terapi 1 (P3)	0.8642 ± 0.19976 ^b		36,81%
Terapi 2 (P4)	0.5150 ± 0.04933 ^c		62,31%
Terapi 3 (P5)	0.1777 ± 0.07420 ^a		87,00%

Keterangan : Notasi a, b, c dan d menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar perlakuan.

Hasil uji normalitas kadar MDA pada lima kelompok perlakuan (**Lampiran 8**) menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa populasi berdistribusi normal. Hasil uji homogenitas varians menunjukkan $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa variansi data sama. perhitungan menggunakan ANOVA menunjukkan bahwa terapi klorofil berpengaruh nyata ($P < 0,05$) terhadap penurunan kadar MDA (**Tabel 5.3**). Hasil uji *Tukey Test* pada lima kelompok perlakuan menunjukkan kadar MDA pada kelompok P5 menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan ($p > 0,05$) terhadap kelompok P1. Nilai rata-rata kadar MDA pada kelompok tikus kontrol negatif P1 merupakan standar rata-rata kadar MDA tikus dalam keadaan normal.

Pengukuran kadar MDA menunjukkan hasil pada kelompok kontrol negatif P1 memiliki kadar MDA 0.0952 ± 0.05058 . Adanya kadar MDA tersebut menunjukkan bahwa radikal bebas juga terdapat pada tikus kontrol. Hal itu terjadi karena radikal bebas juga diperlukan didalam tubuh berasal dari proses metabolik yang normal dalam tubuh manusia, lebih dari 90% oksigen diproduksi dari proses metabolik tubuh yaitu melalui, proses oksidasi makanan dalam menghasilkan tenaga di mitokondria yang dikenal sebagai *electron transport chain* dan akan memproduksi radikal bebas yang dapat membantu sel darah putih atau leukosit untuk menghancurkan atau memakan kuman yang masuk ke dalam tubuh. Radikal bebas merupakan senyawa yang digunakan untuk pematangan sel didalam tubuh. Radikal bebas juga digunakan oleh tubuh untuk membunuh mikroorganisme patogen sebagai salah satu pertahanan tubuh melawan infeksi (Matsue *et al.*, 2003).

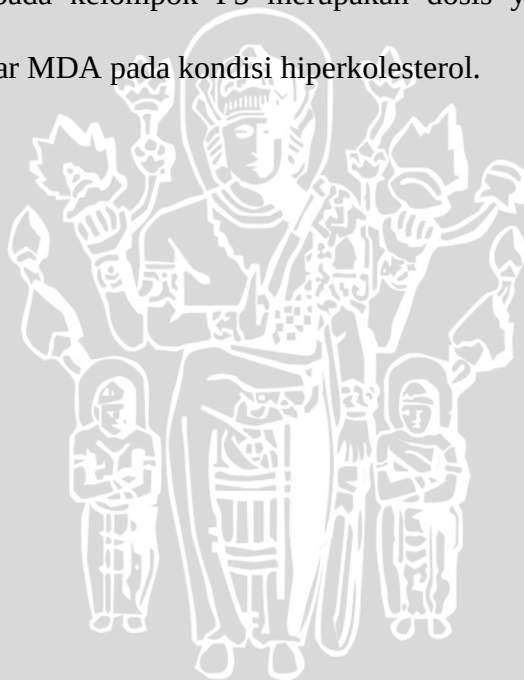
Kelompok hiperkolesterol P2 memiliki kadar MDA 1.3664 ± 0.14472 dengan peningkatan sebanyak 1.335% dan berbeda sangat signifikan dibandingkan dengan kelompok tikus kontrol negatif P1. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian pakan tinggi kolesterol berupa tepung ikan, kedelai, dedak padi, karak, jagung, tepung terigu, mineral, lemak babi, tetes, dan multivitamin menyebabkan peningkatan kadar kolesterol melebihi batas normal dalam darah. Tubuh berusaha menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu yang mekanismenya terjadi dihati. Peningkatan sintesis asam empedu di hati menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingannya dan berikatan dengan lipid yang akan menyebabkan terjadinya peroksidasi lipid. Peroksidasi secara terus menerus menghasilkan senyawa MDA yang berlebih. Hal ini sesuai dengan pendapat Aulanni'am (1993) bahwa pemberian konsumsi pakan dengan tinggi kolesterol dan asam lemak jenuh mempengaruhi terjadinya tinggi kolesterol. Tubuh pada kondisi hiperkolesterol akan menyeimbangkan kadar kolesterol plasma dengan jalan mengubah kolesterol menjadi asam empedu. Peningkatan sintesis asam empedu menghasilkan radikal bebas sebagai hasil sampingannya. Semakin banyak asam empedu yang disintesis, semakin banyak oksigen yang diperlukan, sehingga radikal bebas terbentuk secara berlebihan.

Pemberian ekstrak tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada kelompok perlakuan P3, P4, dan P5 dapat menurunkan kadar MDA. Kelompok perlakuan P3 memiliki kadar MDA 0.8642 ± 0.19976 mg/dL

dengan penurunan kadar MDA sebesar 36,81% menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol hiperkolesterol dan kontrol negatif. Kelompok perlakuan P4 memiliki kadar MDA 0.5150 ± 0.04933 mg/dL dengan penurunan kadar MDA sebesar 62,31% menunjukkan berbeda signifikan ($p < 0,05$) terhadap kontrol hiperkolesterol dan kontrol negatif. Kelompok perlakuan P5 memiliki kadar MDA 0.1777 ± 0.07420 mg/dL dengan penurunan kadar MDA sebesar 87,00% menunjukkan berbeda signifikan terhadap kontrol hiperkolesterol ($p < 0,05$) dan tidak berbeda signifikan terhadap kontrol negatif ($p > 0,05$). Hasil analisis tersebut menunjukkan bahwa kelompok perlakuan P5 merupakan dosis efektif untuk menurunkan kadar MDA tikus putih. Hal ini dikarenakan kadar MDA pada kelompok perlakuan P5 mendekati kadar MDA kelompok negatif. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa aktif flavonoid sebagai antioksidan pada klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) memiliki kemampuan untuk mereduksi radikal bebas atau anti radikal sebagai proteksi terhadap *Reactive Oxygen Species* (ROS), sehingga kandungan flavonoid ekstrak tanaman alfalfa sebagai antioksidan berpengaruh dalam menghambat terbentuknya radikal bebas berlebih akibat tingginya kolesterol pada darah (Giorgio, 2000). Mekanisme kerja flavonoid adalah menghambat pembentukan peroksidasi lipid pada tahap inisiasi dengan berperan sebagai *scavengers* (peredam) terhadap radikal bebas oksigen reaktif (O_2) maupun radikal hidroksil (OH). Cara kerjanya dengan memberikan donor atom H kepada radikal peroksil membentuk radikal flavonoid dan akan bereaksi dengan

oksigen reaktif (superoksida) sehingga menjadi netral. Dengan reaksi tersebut, reaksi berantai peroksidasi lipid dapat dihentikan (Pribadi, 2010).

Kelompok tikus terapi klorofil dari tanaman alfalfa (*Medicago sativa*) pada pemberian dosis 1,08 mg/200 g BB pada kelompok P5 menunjukkan penurunan MDA paling maksimum dan menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan ($P > 0,05$) terhadap kelompok kontrol negatif (P1) (**Tabel 5.3**). Hal ini menunjukkan bahwa terapi klorofil tanaman alfalfa dengan dosis 1,08 mg/200 g BB pada kelompok P5 merupakan dosis yang efektif untuk menurunkan kadar MDA pada kondisi hiperkolesterol.



BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian serta analisis yang dilakukan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat disimpulkan:

1. Terapi klorofil alfalfa (*Medicago sativa*) meningkatkan kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterol dan dosis 1,08 mg/200 g BB menunjukkan nilai yang terbaik dalam peningkatan kadar HDL.
2. Terapi klorofil alfalfa (*Medicago sativa*) menurunkan kadar malondialdehida (MDA) pada tikus (*Rattus norvegicus*) hiperkolesterol dan dosis 1,08 mg/200 g BB menurunkan kadar MDA hingga mendekati kontrol negatif.

6.2 Saran

Perlu dikaji lebih lanjut mengenai dosis terapi klorofil alfalfa (*Medicago sativa*) sehingga dapat menentukan dosis optimal dalam meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar MDA pada tikus putih yang diberi diet tinggi kolesterol.

DAFTAR PUSTAKA

- Aulanni'am. 1993. *Effect Des Fibres Duriz Sur Le Profil Lipidique Du Rat Comparison Entre Le Riz Cargo Et Les Fibres Buson*. USTL. Monteepeillies France.
- Baigent, C and R. Clarke. 2008. *Cholesterol And Lipids*. International Encyclopedia Of Puplic Health. Elsevier Inc, USA.
- Barriga, C. V and F. E. Fonturble. 2011. Cholesterol, Glucose and Triglycerides Role In The Prevalence Of Hyperlipidemia In Dogs At Higher Elavations. *Revista Cientificia, Fev-Luz* **21**(1): 22-26
- Bastard, J. P., M. Maachi, C. Lagathu, M. J. Kim, M. Caron, H. Vidal, J. Capeau, and B. Feve. 2006. Recent Advances in the Relationship Between Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance. *PubMed US National Library of Medicine*. **17**(1):4-12.
- Bauer, J. E. 2004. Lipoprotein-Mediated Transport Of Dietary And Synthesized Lipids And Lipid Abnormalities Of Dogs And Cats. *JAVMA* **224**(5): 668-675
- Caunii, A., G. Pribac, I. Gozea, D. Gaitin, and I. Samfira. 2012. Design of Optimal Solvent for Extraction of Bio-Active Ingedients from Six Varieties Of Medicago sativa. *Chemistry Central Journal* **6**:123.
- Cheng, Z. J. and R. W. Hardy. 2004. *Protein And Lipid Sources Affect Cholesterol Concentrations Of Juvenile Pacific*. *J.Anim. Sci.* **82**: 1136-1145
- Evans, M. D and M. S. Cooke. 2006. *Lipid and Protein Mediated Oxidative Damage to DNA*. In: Singh, K.S., editor. *Oxidative Stress, Disease and Cancer*. Singapura: Mainland Press. 201-220.
- Gani, N., I. M. Lidya, dan M. P. Mariska. 2013. Profil Lipida Plasma Tikus Wistar yang Tinggi kolesterol pada Pemberian Gedi Merah (*Abelmoschus manihot* L.). *Jurnal MIPA UNSRAT Online* **2**(1) 44-49 Jurusan Kimia.FMIPA. Unsrat, Manado.
- Giorgio, P., 2000, Flavonoid as Antioxidant. *Journal National Product*, **63**: 1035-1045.
- Gopper, S.S., J.L. Smith, and J.L. Goff. 2009. *Advanced Nutrition and Human Metabolism*. Edisi ke 5. Canada: Wadsworth. hal 131-77.
- Gundy, S. M. 2006. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Edisi ke 10. USA: Lippincott Williams & Wilkins. hal. 1076-94
- Hapsoh. (2008). *Textbook*. Diakses tanggal 26 September 2014. ecourse.usu.ac.id/content/budidaya/agonomi/textbook.pdf.

- Hartoyo, A., N. Dahrulsyah, Sripalupi dan P. Nugoho. 2008. Pengaruh Fraksi Karbohidrat Kacang Komak (Lablab Purpureus (L) Sweet). *Jurnal teknologi dan industri pangan*, **19**: 25-31
- Janero, D. R. 2001. Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid Activity as Diagnosis Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissues Injury. *Free Radical Biology & Medicine*; **9**: 515-40.
- Jeyabalan, A. and S. N. Caritis. 2006. Antioxidant and The Prevention of Preeclampsia-Unresolved Issues. *New England J Med*; **354**(17): 1841-3.
- Junaidi. 2000. *Pencegahan dan Pengobatan Stroke*. Buana Ilmu Populer. Jakarta.
- Karimah, F. 2010. *Pengaruh Pemberian Klorofil Dari Tanaman Alfalfa (Medicago Sativa) Terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Strain Wistar*. [SKRIPSI]. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- Krummel, D. A. 2008. *Medical Nutrition Therapy For Cardiovascular Disease*. Edisi ke 12. Canada: Saunders Elsevier. hal.833–64.
- Limantara, I. (2009). Potensi Fotooksidoproteksi kurkumin terhadap klorofil a dan b. <http://fisika.ub.ac.id/bss> . (26 September 2014)
- Luczaj, W. and S. Elzbieta. 2003. DNA Damage Caused by Lipid Peroxidation Products. *Cellular and Molecular Biology Letters* **8**: 391 – 413.
- Matsue, H., D. Edelbaum, D. Shalhevet, N. Mizumoto, C. Yang, M. E. Mummert, J. Oeda, H. Masayusu and A. Takashima. 2003. Generation and Function of Reactive Oxygen Species in Dendritic Cell During Antigen Presentation. *J immunol* 2003; **171**: 3010-3018
- Murray, R. K., D. K. Ganner, and V. W. Rodwell. 2003. *Biokimia Harper*. Penerjemah: Andry Hartono. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Murwani S., M. Ali, K. Muliarta. 2006. Diet Aterogenik pada Tikus Putih (Rattus norvegicus strain Wistar) Sebagai Model Hewan Aterosklerosis. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **22** (1) : 1-6.
- Nafrialdi, S. 2007. *Farmakologidan Terapi Edisi ke-5*. Gaya Baru. Jakarta
- Parman, S dan S. Harnina. 2008. *Pertumbuhan, kandungan klorofil dan serat kasar pada defoliasi pertama alfalfa (Medicago sativa L) akibat pemupukan mikorisa*. Buletin Anatomi dan Fisiologi **16**:1-6.
- Payne, M. 2005. *Kiat Menghindari Penyakit Jantung*. Jakarta: Penerbit PT. Gamedia Pustaka Mahasiswa.
- Permatasari, N. 2012. *Manual Prosedur Pengambilan Darah, Perlakuan, dan Injeksi pada Hewan Coba*. Universitas Brawijaya: Malang.
- Pribadi, F.W. dan Ernawati, D. A., 2010, *Efek Catechin terhadap Kadar Asam Urat, C Reaktif Protein (CRP) dan Malondialdehid Darah Tikus Putih (Rattus norvegicus) Hiperurisemia*, Jurnal, Fakultas Kedokteran dan Ilmu-Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

- Price, S. 2005. *Textbook of Pathophysiology*. 6th ed. Jakarta : EGC.
- Price, S. A., M. Lorraine, and Wilson. 2006. *Patofisiologi Konsep Klinis Proses-Proses Penyakit*. edisi 6. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Rahmayanti, E dan M. Sitanggang. 2006. *Taklukkan Penyakit dengan Klorofil Alfalfa*. PT Agomedia Pustaka. Jakarta.
- Ratnayanti, D. 2011. *Pemberian Growth Hormon Memperbaiki Profil Lipid dan Menurunkan Kadar MDA (Malondialdehyde) Pada Tikus Jantan yang dislipidemia* [TESIS]. Progam Pascasarjana Universitas Udayana. Denpasar.
- Razak, A. 2007. *Terapi Pemberian Klorofil Alfalfa Pada Penyakit Tinggi kolesterol*. Alex Media Komputindo. Jakarta.
- Ricardi, G., Rivellese and C. Williams. 2003. *The Cardiovascular System.. Nutrition and Metabolism*. Edisi ke 1. Geat Britain: Blackwell Science. hal.225–46. 22
- Saefuddin, A., K. A. Notodiputro, A. Alamudi, dan K. Sadik. 2009. *Statistika Dasar*. Jakarta: Indonesia.
- Saragih, S. 2009. *Pengaruh Pemberian Infus Daun Seledri Terhadap Kadar Kolesterol Serum Darah Marmut*. [SKRIPSI]. Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Schlesinger, D. P. 2011. Raw food diets in companion animals: *A critical review*. *Canadian Veterinary Journal*. **52**(1): 50–54
- Septiana, A. T., H. Dwiyanti, D. Muchtad, dan F. Zakaria. 2006. Penghambatan Oksidasi LDL dan Akumulasi Kolesterol Pada Makrofag oleh Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, **17** (3): 221
- Shi, Y., R. Guo, X. Wang, D. Yuan, S. Zhang, J. Wang, X. Yan, and C. Wang. 2014. Hypercholesterolemia and Microvascular Dysfunction: Interventional. *Startegies. Journal Of Inflammation* 2010, 7:54
- Sibernalg, S and F. Lang. 2003. *Teks Atlas Berwarna Patofisiologi*. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta.
- Sirait, J., M. Syawal, dan K. Simanihiruk. 2010. *Tanaman Alfalfa (Medicago satvila L.) Adaptif Dataran Tinggi Iklim Basah sebagai Sumber Pakan: Morfologi, Produksi, dan Palatabilitas*. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Sumatera Utara.
- Suyitno. 2008. *Modul Pengayaan Materi Klorofil atau Pigmen Fotosintesis*. FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Undersander, D., F. A. Gey, K. Kelling, and M. E Rice. 2013. *Alfalfa Analyst*. Edisi ke 3. Kennewick: National Alfalfa Alliance.
- Valko, M., et al. 2006. *Free Radical, Metal And Antioxidant In Oxidative Stress Induced Cancer*, J.Chem-BioI, Rusia, edisi 160,p. 1-40

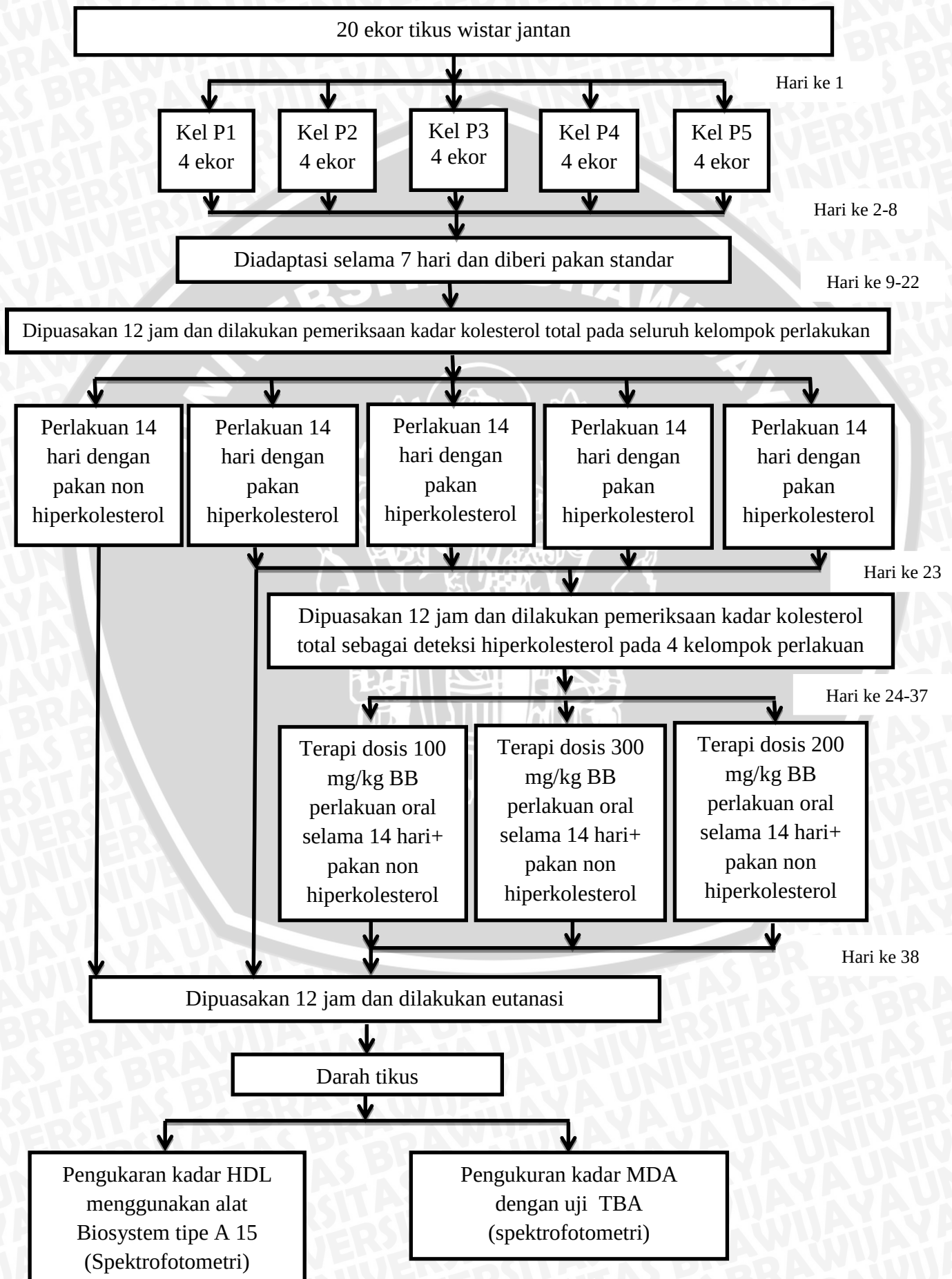
- Vanessa, R., L. M. E. Purwjiantiningsih, dan Y. Aida. 2014. *Pemanfaatan Minuman Serbuk Instan Kayu Manis (Cinnamomum burmanii Bl.) untuk Menurunkan Kadar Kolesterol Total Darah Tikus Putih (Rattus norvegicus)*. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta.
- Wahdania, F. 2012. *Pengaruh Pemberian Kefir Susu Sapi Terhadap Kadar Kolesterol Total Tikus Jantan Sprague Dawley*. Program Studi Ilmu Gizi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro. Semarang.
- Widiyana, D. 2012. *Effect of Water Extract Persimmon fruit (Diospyros kaki L.f.) to Malondialdehyde levels (MDA) and Arthritis Rat (Rattus norvegicus) Joint Histopathology*. [Skripsi]. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta;50-55.
- Wresdiyati, T., M. Astawan., and L. Y. Hastanti. 2006. Profil Malondialdehida (MDA). Pada Jaringan Hati Tikus dengan Kondisi Tinggi kolesterol. *J. Hayati* **13**: 85-89



UNIVERSITAS BRAWIJAYA



LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional Rancangan Penelitian

Lampiran 2. Induksi Tinggi kolesterol

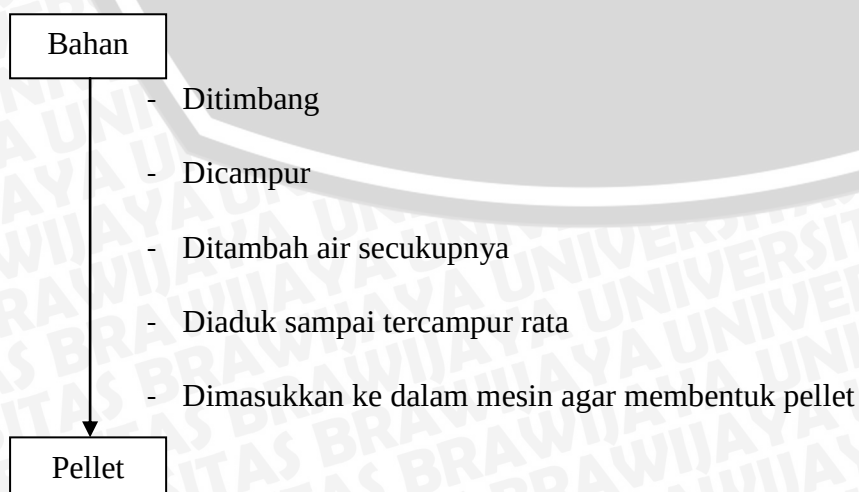
Pemberian pakan tinggi kolesterol berdasarkan (Vanessa, 2014) adalah sebagai berikut :

Komposisi pakan :

Komposisi	Pakan Kontrol	Pakan Hiperkolesterol
Tepung ikan	23%	30%
Kedelai	6%	4%
Dedak padi	10%	0%
Karak	31,5%	30%
Jagung	20%	2%
Tepung Terigu	5%	0%
Mineral	2%	2,5%
Lemak	0%	28%
Tetes	2%	3%
Multivitamin	0,5%	0,5%
TOTAL	100 %	100%

Kandungan Nutrisi Pakan

	Pakan Kontrol	Pakan Hiperkolesterol
Bahan Kering	91,2105	93,2758
Abu	12,3311	12,8968
Protein Kasar	17,5343	17,0854
Lemak Kasar	3,8865	30,6589
Serat Kasar	5,8740	2,3453
Bahan Ekstrak tanpa N (BETN)	50,7847	30,4394
Metabolize Energy (ME)	2746,273	3901,242



Induksi Hewan Model Tinggi kolesterol

Tikus

- Ditimbang pakan 10% dari BB
- Induksi dilakukan pada kelompok P2, P3, P4 dan P5.
- Dilakukan selama 14 hari setelah pengukuran kadar kolesterol total yang pertama

Tinggi kolesterol



Lampiran 3. Hasil Analisis Laboratorium Kandungan Nutrisi Pakan



UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PETERNAKAN
BAGIAN NUTRISI DAN MAKANAN TERNAK
Jalan Veteran Malang 65145 Telp (0341) 575853
E-mail : bagnmtfapet@ub.ac.id

Nomor : 097 /UN.10.5.52./Lab.-1/2015
Perihal : Hasil Analisa

Yth. : Sdr. Anggita
Mhs. S1 PKH UB
Malang

Hasil analisis Laboratorium

Tanggal Terima Sampel	No	Kode Bahan	Kandungan Zat Makanan (is as)*
			Lemak Kasar (%)
26-2-2014	1.	PELLET KASAR	4,42
	2.	PELLET HALUS	26,54

*) sampel dianalisis seperti pada saat diterima



Mengetahui
Ketua Bagian NMT

Dr. Oskar Sjoftan, MSc
NIP 19600422 198811 1 001

Malang, 02 Maret 2015
Ketua Lab. NMT

Heli Tistiana, S.Pt., MP
NIP 19740826 200812 2 001

NMT. 081

Lampiran 4. Perhitungan Dosis Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago sativa*)

Dosis klorofil yang diberikan untuk tujuan pengobatan adalah 100 – 300 mg/kg BB/hari (Karimah, 2010). Menurut tabel konversi dosis, menyebutkan bahwa faktor konversi manusia dengan berat badan 70 kg ke tikus dengan berat 200 g adalah 0,018. Konsentrasi klorofil yang digunakan adalah 8 mg/mL (pada kemasan: 4 g/500 mL).

a. Kelompok P3

Dosis Terapi

$$\begin{aligned} 0,018 \times 100 &= 1,8 \text{ mg/kg BB} \\ &= 0,36 \text{ mg/200 g BB} \end{aligned}$$

Volume Terapi

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 8 V_1 &= 0,36 \times 1 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,36/8 \\ V_1 &= 0,045 \text{ mL} \end{aligned}$$

Sebanyak 0,045 ml klorofil diencerkan dengan aquades hingga 1 ml, kemudian diberikan pada tikus secara sonde lambung.

b. Kelompok P4

Dosis Terapi

$$\begin{aligned} 0,018 \times 200 &= 3,6 \text{ mg/kg BB} \\ &= 0,72 \text{ mg/200 g BB} \end{aligned}$$

Volume Terapi

$$\begin{aligned} N_1 \times V_1 &= N_2 \times V_2 \\ 8 V_1 &= 0,72 \times 1 \text{ mL} \\ V_1 &= 0,72/8 \\ V_1 &= 0,09 \text{ mL} \end{aligned}$$

Sebanyak 0,09 ml klorofil diencerkan dengan aquades hingga 1 ml, kemudian

c. diberikan pada tikus secara sonde lambung.

Dosis Terapi

$$0,018 \times 300 = 5,4 \text{ mg/kg BB}$$

$$= 1,08 \text{ mg/200 g BB}$$

Volume Terapi

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$8 \text{ V1} = 1,08 \times 1 \text{ mL}$$

$$V1 = 1,08/8$$

$$V1 = 0,135 \text{ mL}$$

Keterangan:

V = Konsentrasi

N = Konsentrasi

Sebanyak 0,135 ml klorofil diencerkan dengan aquades hingga 1 ml, kemudian diberikan pada tikus secara sonde lambung.



Lampiran 5. Perhitungan Penurunan dan Peningkatan Kadar HDL serum

Pengaruh Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago Sativa*) Terhadap Kadar HDL (*High Density Lipoprotein*) Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol. Presentasi penurunan dan peningkatan dapat dihitung sebagai berikut :

- ✓ Perhitungan Penurunan Kadar HDL terhadap Kelompok Kontrol

$$\text{Penurunan} = \frac{\text{kelompok kontrol} - \text{kelompok hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{118,75 - 28,500}{28,500} \times 100\%$$

$$= 316,67\%$$

- ✓ Perhitungan Peningkatan Kadar HDL terhadap Kelompok Terapi Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok terapi 100 mg} - \text{kelompok Hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{64,250 - 28,500}{28,500} \times 100\%$$

$$= 125,43\%$$

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok terapi 200 mg} - \text{kelompok Hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{78,500 - 28,500}{28,500} \times 100\%$$

$$= 175,43\%$$

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok terapi 300 mg} - \text{kelompok Hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{97,000 - 28,500}{28,500} \times 100\%$$

$$= 240,35\%$$

Lampiran 6. Hasil Uji Statistika Kadar HDL menggunakan SPSS ver. 22.0

Data Uji Kadar HDL

Kelompok	Ulangan	Kadar HDL
1	1	28.0
1	2	34.0
1	3	25.0
1	4	27.0
2	1	68.0
2	2	69.0
2	3	58.0
2	4	62.0
3	1	72.0
3	2	80.0
3	3	83.0
3	4	79.0
4	1	99.0
4	2	93.0
4	3	106.0
4	4	90.0
5	1	125.0
5	2	111.0
5	3	112.0
5	4	127.0

Deskriptif

Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Sehat	4	118.7520	8.42120	4.21060	111.00	127.00
Sakit	4	28.5000	3.87298	1.93649	25.00	34.00
T1	4	64.2500	5.18813	2.59406	58.00	69.00
T2	4	78.5000	4.65475	2.32737	72.00	83.00
T3	4	97.0000	7.07107	3.53553	90.00	106.00
Total	20	77.4000	31.78116	7.10648	25.00	127.00

Uji ANOVA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	18637.300	4	4659.325	126.269	.000
Within Groups	553.500	15	36.900		
Total	19190.800	19			

- Keterangan : Dari daftar tabel menunjukkan bahwa $F(0,05) = 3,06$ dan $F(0,01) 1\% = 4,56$. Hasil yang didapat $F_{hitung} > F_{tabel} 1\%$, maka diantara perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.555	4	15	.082

Uji Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		HDL
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	77.4000
	Std. Deviation	3.17812E1
Most Extreme Differences	Absolute	.114
	Positive	.114
	Negative	-.084
Kolmogorov-Smirnov Z		.510
Asymp. Sig. (2-tailed)		.957

a. Test distribution is Normal.

Uji Tukey

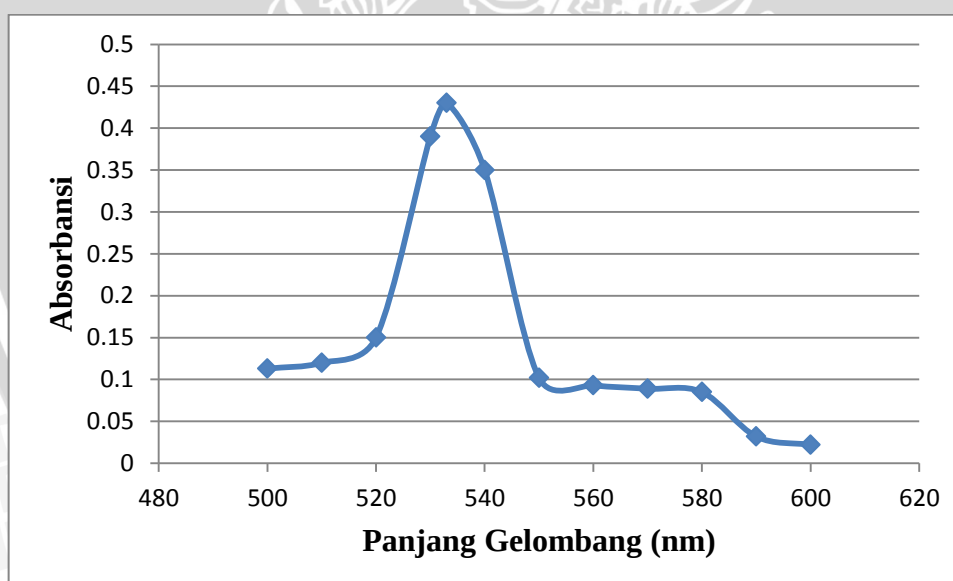
	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD ^a	Sakit	4	28.5000				
	T1	4		64.2500			
	T2	4			78.5000		
	T3	4				97.0000	
	Sehat	4					1.187520
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000



Lampiran 7. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum MDA

Tabel 7.1. Absorbansi larutan standard malondialdehida 4 ppm pada berbagai panjang gelombang.

λ (nm)	Absorbansi
500	0,113
510	0,12
520	0,15
530	0,39
533	0,43
540	0,35
550	0,102
560	0,093
570	0,089
580	0,085
590	0,032
600	0,022



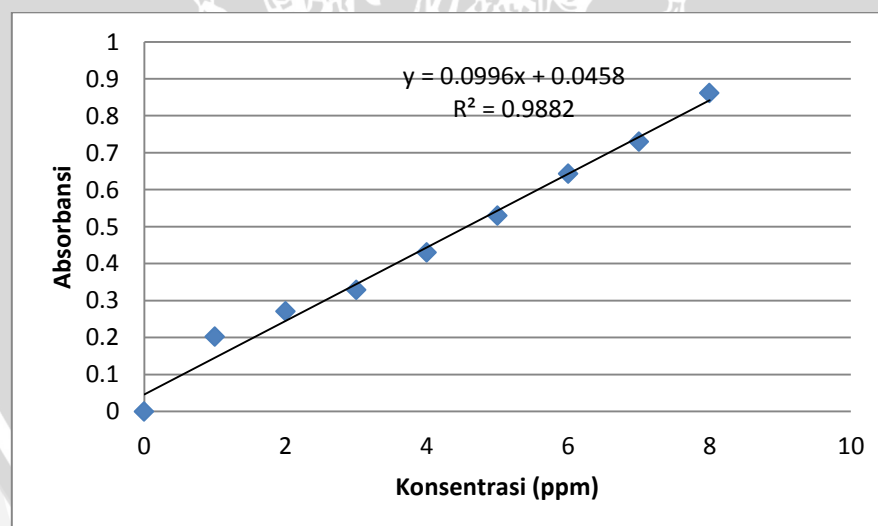
Gambar L.6.1. Kurva Serapan MDA

Absorbansi larutan standar MDA terbesar didapatkan pada panjang gelombang 533 nm, pengukuran menggunakan larutan MDA 4 $\mu\text{L/mL}$ dengan variasi panjang gelombang. Panjang gelombang ini merupakan panjang

gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan standar MDA dan sampel.

Tabel 7.2 Absorbansi Larutan Standar Malodialdehida λ maksimal = 533 nm pada berbagai konsentrasi.

Konsentrasi Larutan Standar ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi
0	0,000
1	0.202
2	0.271
3	0.329
4	0.43
5	0.53
6	0.643
7	0.73
8	0.861



Gambar 6.2. Kurva Baku MDA pada λ maksimal 533 nm.

Lampiran 8. Absorbansi dan Konsentrasi kadar MDA

Perhitungan kadar Malondialdehida (MDA) dilakukan untuk semua nilai absorbansi dengan menggunakan persamaan kurva standar MDA (**Gambar 8.2**) $y = 0.099x + 0.045$.

Contoh perhitungan Kadar MDA adalah

$$\begin{aligned} y &= 0.099x + 0.045 \\ 0.058 &= 0.099x + 0.045 \\ x &= (0.058 - 0.045) / 0,099 = \mathbf{0.131313} \text{ (}\mu\text{g/mL)} \end{aligned}$$

Tabel L.8.1 Data Absorbansi dan Konsentrasi kadar MDA

	Absorbansi rata-rata	Kadar Malondialdehida ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol Negatif	0.058	0.131313
	0.053	0.080808
	0.048	0.030303
	0.059	0.141414
Rerata		0.09596
Kontrol Positif	0.171	1.272727
	0.198	1.545455
	0.167	1.232323
	0.186	1.424242
Rerata		1.368687
Terapi 100	0.158	1.141414
	0.114	0.69697
	0.118	0.737374
	0.132	0.878788
Rerata		0.863636
Terapi 200	0.098	0.535354
	0.101	0.565657
	0.094	0.494949
	0.091	0.464646
Rerata		0.515152
Terapi 300	0.054	0.090909
	0.064	0.191919
	0.061	0.161616
	0.072	0.272727
Rerata		0.179293

Lampiran 9. Perhitungan Peningkatan dan Penurunan Kadar MDA serum

Pengaruh Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa (*Medicago Sativa*) Terhadap Kadar HDL (MDA (*Malondialdehida*) Pada Tikus Putih (*Rattus Novergicus*) Yang Diberi Diet Tinggi Kolesterol. Presentasi penurunan dan peningkatan dapat dihitung sebagai berikut :

- ✓ Perhitungan Peningkatan Kadar MDA terhadap Kelompok Kontrol

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok hiperkolesterol} - \text{kelompok kontrol} \times 100\%}{\text{Kelompok kontrol}}$$

$$= \frac{1.3664 - 0.0952}{0.0952} \times 100\%$$

$$= 1.335.29\%$$

- ✓ Perhitungan Penurunan Kadar MDA terhadap Kelompok Terapi Pemberian Klorofil Tanaman Alfalfa

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok Hiperkolesterol} - \text{kelompok terapi 100 mg} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{1.3664 - 0.8642}{1.3664} \times 100\%$$

$$= 36,81\%$$

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok terapi 200 mg} - \text{kelompok Hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{1.3664 - 0.5150}{1.3664} \times 100\%$$

$$= 62,31\%$$

$$\text{Peningkatan} = \frac{\text{kelompok terapi 300 mg} - \text{kelompok Hiperkolesterol} \times 100\%}{\text{Kelompok Hiperkolesterol}}$$

$$= \frac{1.3664 - 0.1777}{1.3664} \times 100\%$$

$$= 87,00\%$$

Lampiran 10. Hasil Uji Statistika Kadar MDA Menggunakan SPSS ver 22

Deskriptif

Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Minimum	Maximum
Sehat	4	.0952	.05058	.02529	.03	.14
Sakit	4	1.3664	.14472	.07236	1.23	1.55
T1	4	.8642	.19976	.09988	.70	1.14
T2	4	.5150	.04933	.02466	.46	.57
T3	4	.1777	.07420	.03710	.09	.27
Total	20	.6037	.49224	.11007	.03	1.55

Uji Normalitas

		MDA
N		20
Normal Parameters ^a	Mean	.6037
	Std. Deviation	.49224
Most Extreme Differences	Absolute	.151
	Positive	.151
	Negative	-.122
Kolmogorov-Smirnov Z		.676
Asymp. Sig. (2-tailed)		.751

Uji ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.390	4	1.097	76.911	.000
Within Groups	.214	15	.014		
Total	4.604	19			

- Keterangan : Dari daftar tabel menunjukkan bahwa $F(0,05) = 3,06$ dan $F(0,01) = 4,56$. Hasil yang didapat $F_{hitung} > F_{tabel}$ 1%, maka diantara perlakuan menunjukkan perbedaan yang sangat nyata ($p < 0,01$).

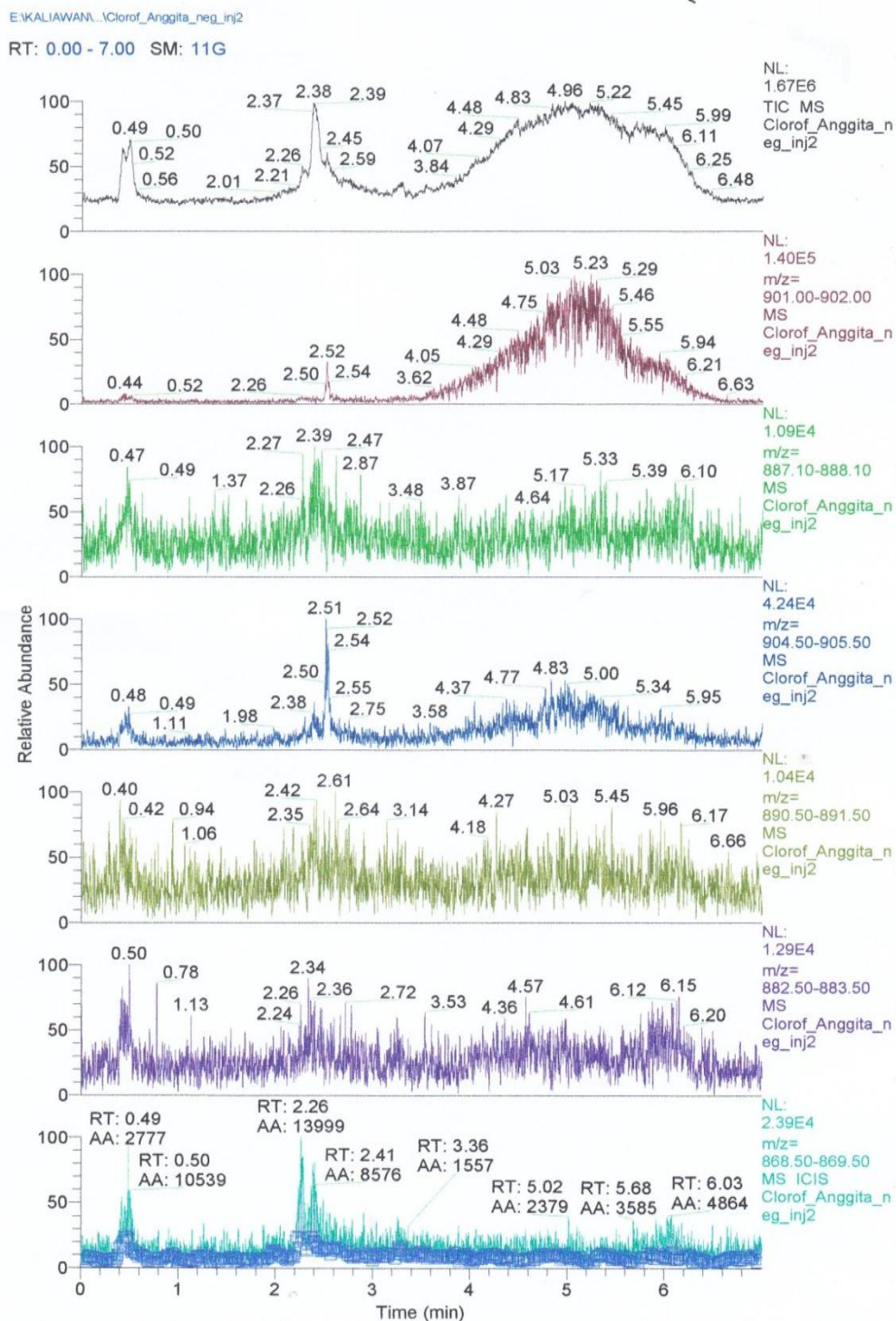
Uji Homogenitas

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.818	4	15	.063

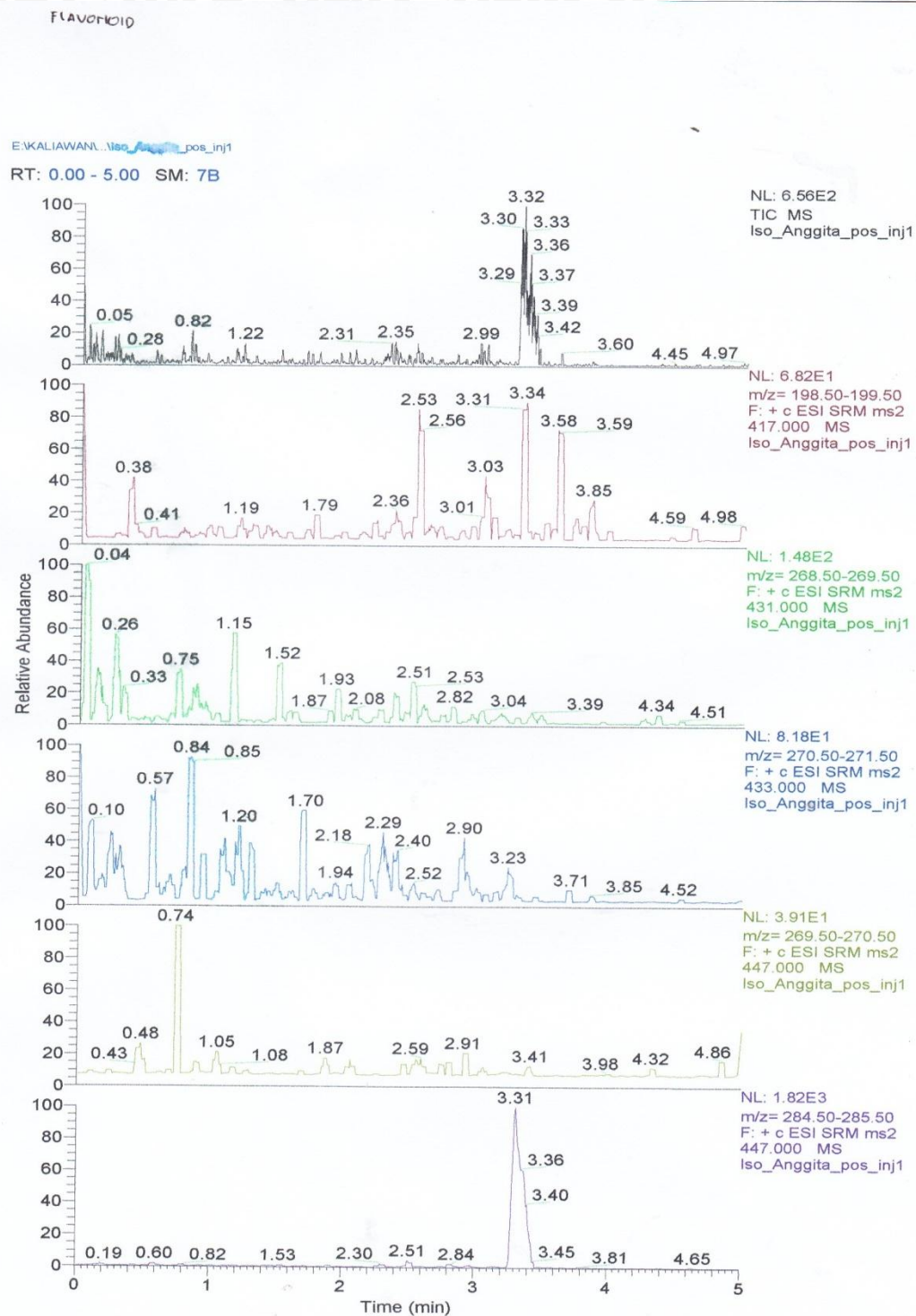
Uji Tukey

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Sehat	4	.0952			
T3	4	.1777			
T2	4		.5150		
T1	4			.8642	
Sakit	4				1.3664
Sig.		.861	1.000	1.000	1.000

Lampiran 11. Hasil Uji LC-MS Kandungan Saponin, Fitol, dan Flavonoid dalam Klorofil Alfalfa



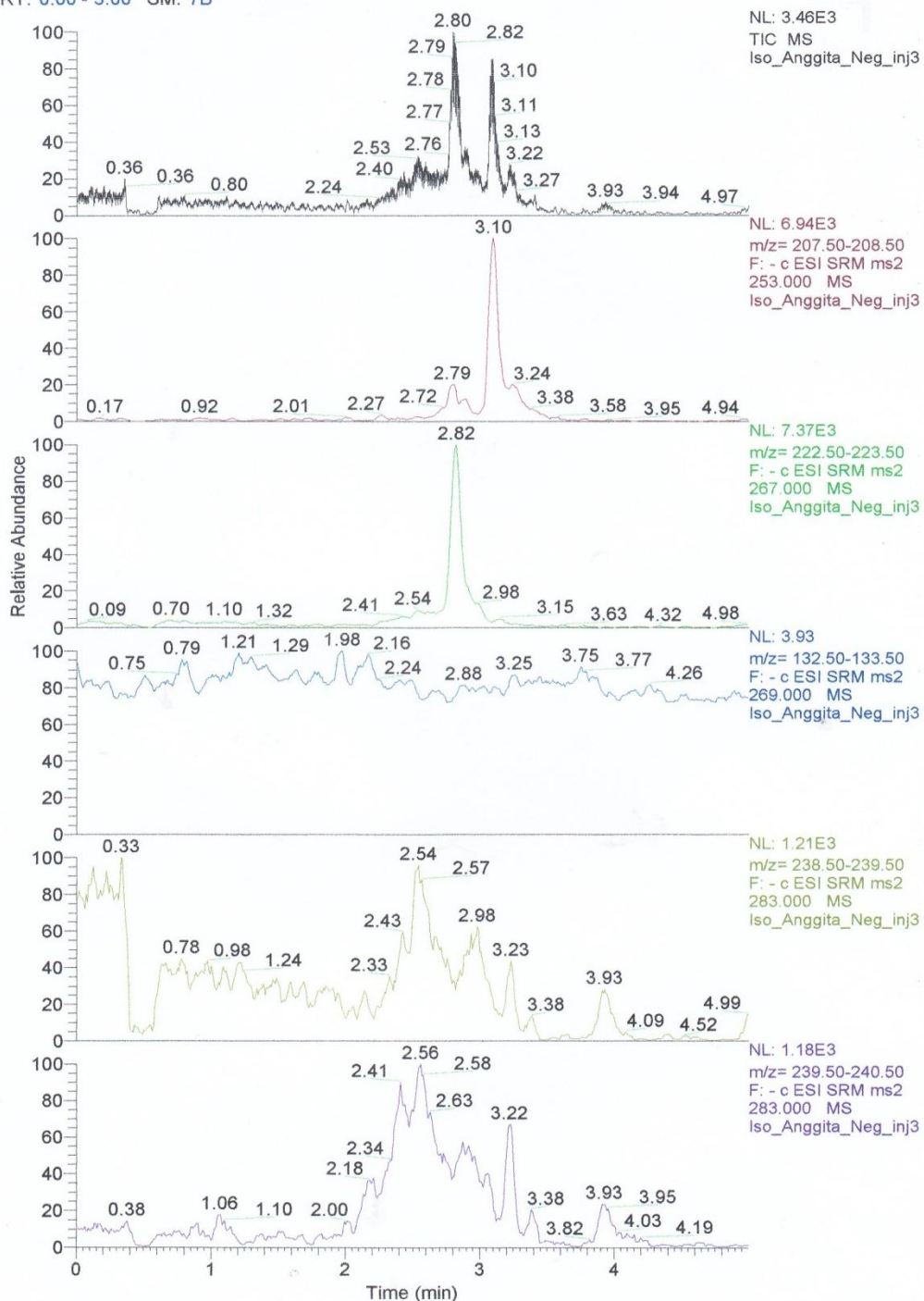
1. Flavonoid



2. Fitol

E:\KALIAWAN\Iso_Anggita_Neg_inj3

RT: 0.00 - 5.00 SM: 7B

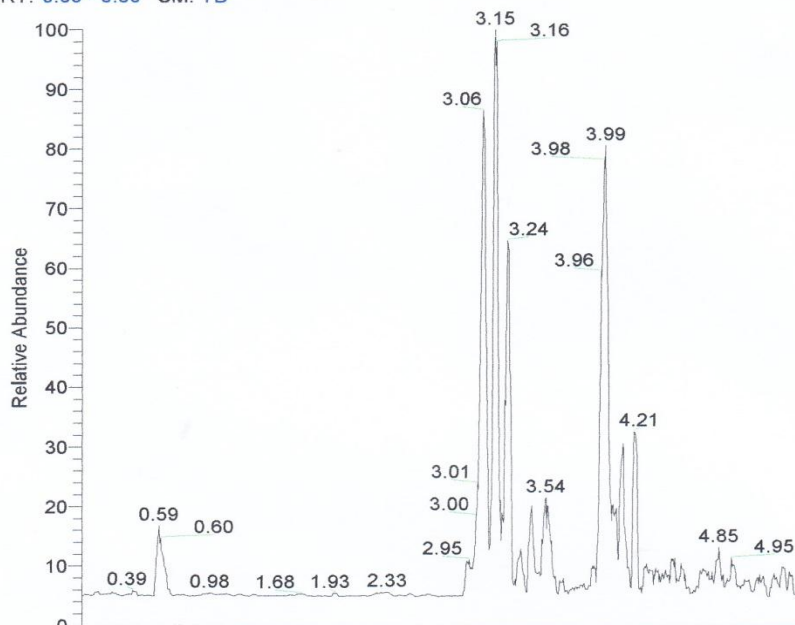


3. Saponin

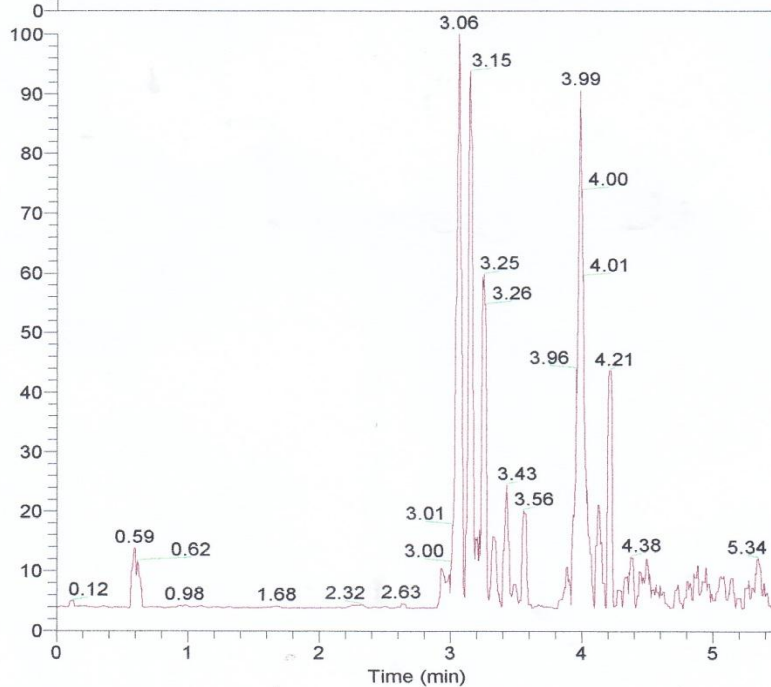
SAPONIN

E:\KALIAWAN\Asiaticos_Anggita_inj3

RT: 0.00 - 5.50 SM: 7B



NL: 1.74E2
TIC MS
Asiaticos_Anggita_i
nj3



NL: 7.50E1
m/z=
469.50-470.50 F: -
c ESI SRM ms2
957.000 MS
Asiaticos_Anggita_i
nj3

Lampiran 12. Sertifikat Layak Etik**KOMISI ETIK PENELITIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA****KETERANGAN KELAIKAN ETIK
"ETHICAL CLEARENCE"****No: 323-KEP-UB****KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)
UNIVERSITAS BRAWIJAYA****TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

PENELITIAN BERJUDUL : EFEK PEMBERIAN KLOOROFIL TANAMAN ALFALFA (*Medicago sativa L*) TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL DAN AKTIFITAS ENZIM LIPOPROTEIN LIPASE PADA TIKUS YANG DIBERI PAKAN HIPERKOLESERO

PENELITI : ANGGITA SETIYA DAMA YANTI

UNIT/LEMBAGA/TEMPAT : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DINYATAKAN : LAIK ETIK

Malang, 19 Maret 2015

Ketua Komisi Etik Penelitian

Universitas Brawijaya

**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.****NIP. 19600903 198802 2 001**