

PENGARUH PEMBERIAN BUBUK EKSTRAK Cu-TURUNAN Klorofil Daun Cincau (*Premna oblongifolia* Merr.) TERHADAP PROFIL LIPID DARAH KELINCI

(The Effect of Cincau (*Premna oblongifolia* Merr.) Leaves copper-derivate chlorophyll Powder on Blood Lipid Profile of Rabbit)

Nurdin^{1,4}, Ali Khomsan², Sri Anna Marliyati², Faisal Anwar², Clara M. Kusharto²
Dewi Ratih Agungpriyono³

ABSTRACT. The aim of this research was to produce cincau copper-derivate chlorophyll powder and to observe its physico-chemical properties and the effect on blood lipid profile of 5 month male New Zealand White rabbits. The blood lipid profile observed were total cholesterol, triglyceride, HDL (high-density lipoprotein) cholesterol, and LDL (low-density lipoprotein) cholesterol. A two months treatment was conducted. A random block design was applied with the following treatment on each experimental unit: P0 (basal diet, negative control), P1 (basal diet with cholesterol 0.1% (w/w) added, positive control), P2 (basal diet with cholesterol 0.1% (w/w) and 16.7 mg/kg-body weight/d natural chlorophyll powder added), P3 (basal diet with cholesterol 0.1% (w/w) and 16.7 mg/kg-body weight/d copper-derivate of chlorophyll powder added), P4 (basal diet with cholesterol 0.1% (w/w) and 50.1 mg/kg-body weight/d copper-derivate of chlorophyll powder added), P5 (basal diet with cholesterol 0.1% (w/w), and 16.7 mg/kg-body weight/d commercial chlorophyll powder added. The results of study showed that cincau leaves chlorophyll extract solution with Cu^{2+} 100 mg/L level produce the cincau copper-derivate chlorophyll powder with highest pH, solubility, and greenness compared to other copper levels. Feeding with copper-derivate of chlorophyll cincau powder (P3) most likely decreased total cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol increased the HDL cholesterol, and decreased atherosclerosis risk after 2 month as compare to feeding contain of natural chlorophyll (P2).

Keywords: *Premna oblongifolia* Merr., copper-derivate chlorophyll powder, total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol, LDL cholesterol

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Konsumsi bahan pangan nabati (sayuran atau dedaunan) sering dikaitkan dengan penurunan risiko menderita penyakit degeneratif, khususnya penyakit jantung koroner (PJK). Hal ini tidak terlepas dari kandungan senyawa bioaktif dari pangan nabati tersebut. Senyawa antioksidan alami yang diduga banyak terdapat dalam sayuran/dedaunan hijau adalah klorofil. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa

klorofil dan turunannya memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan antimutagenik (Marquez *et al.*, 2005; Ferruzzi *et al.*, 2006). Endo *et al.* (1985) melaporkan kemampuan klorofil dalam menangkap radikal, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), yang dihasilkan selama proses ootoksidasi minyak, sehingga dapat memutus rantai oksidasi.

Daun tanaman cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr) yang selama ini banyak dikonsumsi oleh masyarakat, ternyata mengandung klorofil relatif tinggi. Hal ini didasarkan atas hasil penelitian Kusharto dkk. (2008), bahwa daun cincau mempunyai kadar klorofil tertinggi (1709 ppm) dibandingkan daun tanaman lainnya yaitu murbei (844 ppm), katuk (1509 ppm), dan pegagan (832 ppm).

¹ Program Studi Pendidikan Kimia, FPIK Universitas Tadulako, Palu

² Dept. Gizi Masyarakat, Fakultas Ekologi Manusia, IPB

³ Bag. Patologi Dept. Klinik, Reproduksi, Patologi, FKH, IPB

⁴ Alamat Korespondensi: PS. Pendidikan Kimia, FPIK, Univ. Tadulako, Palu. Email: nurdinrahman_67@yahoo.co.id

Klorofil merupakan senyawa yang mudah terdegradasi oleh panas, asam, cahaya, dan oksigen (Gross, 1991; Kotani *et al.*, 1999). Untuk meminimalkan hal tersebut, klorofil dibuat menjadi turunannya. Turunan klorofil adalah klorofil alami yang telah kehilangan ion magnesium dan atau tergantikan oleh mineral lain. Klorofil dan turunannya mempunyai kapasitas antioksidan dan bioavailabilitas yang berbeda. Cu-klorofilin sebagai salah satu turunan klorofil mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan klorofil alami (Marquez *et al.* 2005). Penyerapan klorofil alami oleh sel (*in vitro*) juga relatif lebih rendah dibandingkan dengan turunan klorofil. Ferruzzi *et al.* (2001) melaporkan bahwa penyerapan klorofil alami dari *puree* bayam hanya sebesar 5-10%, sedangkan Na-Cu-klorofilin sebesar 45-60%.

Pembuatan senyawa kompleks klorofil dengan mineral (logam) tertentu bertujuan meningkatkan kestabilan warna hijau ekstrak klorofil yang dihasilkan (von Elbe *et al.*, 1986; Canjura *et al.*, 1999). Salah satu turunan klorofil yang masih relatif terbatas dipelajari efeknya bagi pencegahan penyakit degeneratif adalah turunan klorofil yang mengikat logam tembaga (Cu). Tembaga merupakan salah satu zat gizi mikro yang mempunyai afinitas yang lebih tinggi untuk berikatan dengan ligan, termasuk dengan porfirin pada klorofil, dibanding Zn, dan Mg (Cheng *et al.*, 1982).

Tujuan

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah: (1) mempelajari pembuatan kompleks Cu-turunan klorofil melalui penggantian ion Mg^{2+} dalam klorofil dengan ion Cu^{2+} dalam berbagai konsentrasi, (2) mengetahui karakteristik fisiko-kimia dari bubuk Cu-turunan klorofil dengan kadar Cu^{2+} yang bervariasi, (3) menganalisis kemampuan bubuk kompleks Cu-turunan klorofil daun cincau hijau (*Premna oblongifolia* Merr.) dalam mempengaruhi profil lipid serum darah kelinci, (4) menganalisis daya antioksidasi bubuk kompleks Cu-turunan klorofil dengan mengukur kadar MDA (*malondialdehyde*) hati kelinci, (5) mengkaji potensi bubuk Cu-turunan klorofil dalam mencegah pembentukan lesi aterosklerosis pada aorta kelinci.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Penelitian ini merupakan bagian penelitian "payung" yang dibiayai Sekretariat Badan Litbang Pertanian DEPTA dalam program KKP3T yang bekerja dengan LPPM IPB Bogor (Kusharto dkk., 2008). Penelitian ini dilakukan di Laboratorium : Laboratorium Pengujian Mutu Balitro Cimaung Bogor, dan Laboratorium Puslitbang Gizi Makanan Bogor, Laboratorium Biokimia Patologi TIP Fateta IPB, dan Laboratorium Histopatologi FKH IPB. Penelitian berlangsung dari bulan Januari 2008 hingga Desember 2009.

Metode

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap sebagai berikut:

Ekstraksi klorofil, Penyiapan Turunan Klorofil, Pembuatan Kompleks Cu-Turunan Klorofil

Sebanyak ±50 gram potongan daun cincau hijau dihancurkan dengan blender menggunakan 100 mL etanol 95% selama 3 menit, secara bertahap setiap 1 menit. Hancuran kemudian dituangkan dengan kain saring halus (60 mesh), lalu dengan diperoleh disaring lagi dengan corong *Buchner* menggunakan kertas saring Whatman No.1 dan 42 secara berturut-turut. Penyaringan dilakukan menggunakan pompa vakum. Filtrat dicuci dengan 75 ml etanol 95%, disaring dengan corong *Buchner*. Filtrat diambil sebagai ekstrak kasar klorofil.

Penyiapan Turunan Klorofil dan Pembuatan Kompleks Cu-Turunan Klorofil

Pembentukan turunan klorofil dilakukan dengan cara mengasamkan ekstrak klorofil yang telah diekstrak dengan menambahkan asam klorida hingga pH larutan mencapai 5,0 (Alsuhaili 2004). Setelah itu ditambahkan ekstrak klorofil monohidrat hingga kadarnya dalam ekstrak turunan klorofil adalah 100 mg/L (Kusharto 2008) dengan volume sekitar 180 mL. Ekstrak turunan klorofil yang telah ditambah asam klorida dinaikkan pH-nya hingga 8,5 dengan menambahkan NaOH 1 M. Reaksi dilakukan dalam labu tertutup selama 30 menit pada suhu ruang dan terlindung dari cahaya menggunakan

magnetic stirrer. Setelah reaksi berlangsung sempurna, campuran tersebut ditambahkan dekstrin 3%. Reaksi dilakukan selama 30 menit menggunakan *magnetic stirrer* (Alsuhendra, 2004). Setelah reaksi selesai, campuran dimasukkan ke dalam *freezer* (-20°C) dan didiamkan selama semalam sebelum dikeringkan dengan pengering beku (*freeze dryer*).

Uji Biologis Menggunakan Hewan Percobaan Kelinci

Tahap Masa Perlakuan. Masa adaptasi kelinci selama 2 minggu. Sebanyak 30 ekor kelinci jantan (*New Zealand White*) yang rata-rata berumur 5 bulan, dan berat badan rata-rata 2 kg. Kelinci ini dibagi menjadi 6 perlakuan, sehingga setiap perlakuan terdiri atas 5 ekor kelinci. Masa perlakuan kelinci berlangsung selama 2 bulan. Ransum perlakuan diberikan dalam jumlah kecil yaitu sebanyak 30 gram. Setelah ransum tersebut dipastikan habis dikonsumsi, maka diberikan lagi ransum basal hingga maksimal 100 gram. Percobaan ini menggunakan 6 jenis perlakuan, (P0 sampai P5), dengan rincian sebagai berikut:

- P0 = Ransum basal (kontrol negatif)
- P1 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol (kontrol positif)
- P2 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk ekstrak klorofil
- P3 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk Cu-turunan klorofil
- P4 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 50,1 mg/kg BB bubuk Cu-turunan klorofil
- P5 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk klorofil komersial

Pengambilan Darah dan Pemeriksaan Profil Lipid Serum Kelinci. Sebelum pengambilan darah, sekelompok kelinci terlebih dahulu dipuasakan selama ±12 jam. Kadar lipid darah diukur setelah darah dipisahkan menjadi serum menggunakan sentrifus. Sebanyak 2,5 mL darah kelinci diambil melalui pembuluh darah telinga (*vena auricularis*). Pemisahan serum dari

darah dilakukan dengan sentrifus dengan kecepatan 5000 rpm selama 10 menit.

Analisis Profil lipid darah kelinci. Profil lipid serum ditentukan dengan metode enzim *cholesterol oxidase-p-aminophenozone* (CHOD-PAP). Penentuan kadar KT, dan HDL kolesterol menggunakan metode pengendapan, trigliserida dengan metode *glycerol phosphate oxidase-p-phenozone* (GPO-PAP). Kadar LDL dihitung menggunakan rumus Friedewald, yaitu:

$$\text{LDL kolesterol} = \text{kolesterol total} - \left(\frac{\text{trigliserida}}{5} \right) - \text{kolesterol HDL}$$

Analisis Statistik.

Data profil lipid darah dianalisis dengan Analisis Ragam (ANOVA) menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Jika perlakuan memberikan pengaruh yang nyata, maka pengujian dilanjutkan dengan uji beda Duncan pada taraf 5% (Steel dan Torrie, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Profil Lipid Darah Kelinci Percobaan

Kolesterol Total. Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa pada awal dan satu bulan percobaan rata-rata kolesterol total (KT) kelinci tidak berbeda nyata untuk setiap perlakuan (Tabel 1). Namun setelah percobaan berlangsung 2 bulan, umumnya KT serum cenderung menurun dibandingkan pada 1 bulan percobaan, kecuali P1, cenderung meningkat dan berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan perlakuan lain. Hal ini berarti bahwa ada penghambatan peningkatan KT darah. Semakin kecil persentase perubahan KT menunjukkan jenis ransum tersebut semakin efektif menghambat peningkatan KT darah. Pemberian bubuk Cu-turunan klorofil 16,7 mg/kg/hari (P3) selama 2 bulan percobaan, lebih dapat menghambat peningkatan kadar KT dibanding P2, namun kurang kemampuannya dibanding P0, P4, dan P5 (Tabel 2).

Tabel 1. Rata-Rata Kadar Kolesterol Total pada Awal, Satu, dan Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	Rata-rata kadar kolesterol total (mg/dL) selama percobaan			
	n	Awal	Satu bulan	Dua bulan
P0 (K-)		43,22 ± 17,20 ^a	62,24 ± 27,06 ^a	35,12 ± 7,25 ^a
P1 (K+)		51,13 ± 16,36 ^a	82,14 ± 15,30 ^a	222,87 ± 126,88 ^b
P2		49,33 ± 12,39 ^a	135,50 ± 113,02 ^a	102,64 ± 70,12 ^a
P3		44,22 ± 15,70 ^a	138,56 ± 49,38 ^a	95,24 ± 34,82 ^a
P4		40,28 ± 10,70 ^a	60,40 ± 20,30 ^a	73,47 ± 18,56 ^a
P5		47,63 ± 24,73 ^a	126,21 ± 54,28 ^a	68,12 ± 21,57 ^a

Angka dengan huruf sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

P0 = Ransum basal (kontrol negatif)

P1 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol (kontrol positif)

P2 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk ekstrak klorofil

P3 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk Cu-turunan klorofil

P4 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 50,1 mg/kg BB bubuk Cu-turunan klorofil

P5 = Ransum basal + 0,1% (b/b) kolesterol + 16,7 mg/kg BB bubuk klorofil komersial

Tabel 2 Data Perubahan Kadar Kolesterol Total Kelinci setelah Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	n	Perubahan Kadar Kolesterol Total	
		mg/dL	% terhadap P1
P0 (K-)	3	-8,10 ± 13,22 ^a	-
P1 (K+)	3	171,74 ± 112,10 ^b	100
P2	3	53,31 ± 71,23 ^a	31,04
P3	3	51,02 ± 48,32 ^a	29,71
P4	3	33,19 ± 28,68 ^a	19,33
P5	3	20,49 ± 19,91 ^a	11,93

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Terjadinya penghambatan peningkatan KT serum kelinci sebagai akibat dari pemberian ransum yang mengandung bubuk Cu-turunan klorofil, belum dapat dijelaskan secara pasti. Namun diduga bahwa klorofil dan atau turunannya dapat menghambat penyerapan kolesterol atau menghambat sintesis kolesterol di hati dengan jalan menekan laju aktivitas *HMG-CoA reductase* atau kedua-duanya

Kadar Trigliserida (TG). Rata-rata TG kelinci pada awal percobaan berkisar antara 39,82-97,86 mg/dL. Setelah satu bulan percobaan berkisar antara 27,28-60,36 mg/dL, dan setelah dua bulan percobaan berkisar antara 42,13-120,72 mg/dL. Pengaruh lama pemberian berbagai jenis ransum terhadap kadar TG tampak pada Tabel 3.

Pada Tabel tersebut ditunjukkan bahwa pada perlakuan (0 bulan), kadar TG serum berbeda nyata di antara semua perlakuan. Demikian juga halnya pada 1 bulan dan 2 bulan perlakuan, kadar TG serum juga tidak berbeda nyata di antara semua perlakuan.

Perubahan kadar TG kelinci setelah dua bulan percobaan disajikan pada Tabel 4. Analisis ragam ($\alpha=0,05$) menunjukkan bahwa perlakuan jenis ransum tidak berpengaruh terhadap perubahan kadar TG kelinci. Perlakuan P3 cenderung lebih mampu menurunkan kadar TG, dibanding perlakuan lainnya, namun tidak berbeda nyata.

Tabel 3. Rata-Rata Kadar Trigliserida pada Awal, Satu, dan Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	Rata-rata trigliserida (mg/dL) selama percobaan		
	Awal	Satu bulan	Dua bulan
P0 (K-)	79,73±39,68 ^a	60,36 ± 48,19 ^a	44,14 ± 15,95 ^a
P1 (K+)	39,82±11,97 ^a	33,43 ± 13,14 ^a	120,72 ± 94,15 ^a
P2	46,27±21,22 ^a	40,86 ± 19,43 ^a	42,13 ± 2,76 ^a
P3	97,86±45,40 ^a	57,38 ± 15,79 ^a	57,75 ± 13,95 ^a
P4	83,46±48,90 ^a	29,64 ± 10,19 ^a	60,53 ± 10,32 ^a
P5	61,95±20,65 ^a	27,28 ± 3,90 ^a	50,44 ± 23,14 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Tabel 4 Data Perubahan Kadar Trigliserida Kelinci setelah Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	n	Perubahan Kadar Trigliserida (mg/dL)
P0(K-)	3	-35,59 ± 44,24 ^a
P1(K+)	3	80,90 ± 83,10 ^a
P2	3	-4,14 ± 18,75 ^a
P3	3	-40,11 ± 33,09 ^a
P4	3	-22,92 ± 59,18 ^a
P5	3	-4,14 ± 18,75 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Tabel 5. Rata-Rata Kadar Kolesterol HDL pada Awal, Satu dan Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	Rata-Rata Kolesterol HDL (mg/dL) selama Percobaan		
	Awal	Satu bulan	Dua bulan
P0 (K-)	23,83 ± 13,04 ^a	29,80 ± 6,78 ^a	20,79 ± 5,18 ^a
P1 (K+)	37,29 ± 11,61 ^a	44,33 ± 15,39 ^a	29,77 ± 8,59 ^a
P2	33,26 ± 9,04 ^a	42,30 ± 2,87 ^a	37,03 ± 7,23 ^a
P3	22,36 ± 8,10 ^a	49,08 ± 15,40 ^a	36,01 ± 3,61 ^a
P4	27,43 ± 4,98 ^a	55,76 ± 16,77 ^a	37,24 ± 9,95 ^a
P5	25,99 ± 13,59 ^a	66,72 ± 35,80 ^a	36,06 ± 16,62 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Penurunan kadar TG yang relatif besar pada perlakuan P3 diduga disebabkan oleh adanya pengaruh peningkatan aktivitas enzim lipoprotein lipase akibat pemberian bubuk tersebut. Hal ini didasarkan oleh hasil penelitian Jensen *et al.* (2001) bahwa pemberian alga biru-hijau yang mengandung klorofil dapat meningkatkan aktivitas lipoprotein lipase, suatu enzim yang berperan utama dalam metabolisme lipoprotein kaya trigliserida. Diduga senyawa Cu-turunan klorofil atau beberapa bentuk turunannya, seperti feofitin dan pirofeofitin memberikan pengaruh yang sama terhadap enzim lipoprotein lipase.

Kadar Kolesterol HDL . Rata-rata kadar kolesterol HDL kelinci pada awal percobaan

berkisar antara 22,36 – 37,29 mg/dL. Setelah satu bulan percobaan berkisar antara 29,80 – 66,72 mg/dL, dan setelah dua bulan percobaan berkisar antara 20,79 – 37,24 mg/dL (Tabel 5).

Pada Tabel 6 tampak bahwa setelah percobaan berlangsung dua bulan, kelinci P3 memperlihatkan peningkatan kadar kolesterol HDL yang tertinggi (13,65 mg/dL), dibanding kelompok lain, walaupun tidak berbeda nyata. Hal ini diduga disebabkan oleh pemberian klorofil maupun Cu-turunan klorofil yang dapat menekan kenaikan kadar KT serum melalui pengikatan asam empedu dan mengeluarkannya melalui feses. Kadar kolesterol yang terdapat dalam darah menjadi rendah, sehingga tidak

diperlukan kolesterol HDL dalam jumlah banyak untuk mengangkut kolesterol ke hati.

Tabel 6. Data Perubahan Kadar Kolesterol HDL Kelinci setelah Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	n	Perubahan kadar kolesterol HDL (mg/dL)
P0 (K-)	3	-3,04 ± 7,92 ^a
P1 (K+)	3	-7,52 ± 15,39 ^a
P2	3	3,77 ± 3,62 ^a
P3	3	13,65 ± 5,31 ^a
P4	3	9,81 ± 12,65 ^a
P5	3	10,07 ± 6,85 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Berdasarkan hasil penelitian ini tampak bahwa ada korelasi (negatif) antara kadar kolesterol HDL dengan TG pada perlakuan kelinci yang sama yaitu P3. Namun cenderung tidak berkorelasi dengan kadar KT serum. Kelinci P3 mengalami peningkatan kadar kolesterol HDL serum paling tinggi selama dua bulan perlakuan, namun sebaliknya mengalami peningkatan TG paling rendah. Hal ini sejalan dengan pendapat Widman (1985) bahwa kadar kolesterol HDL cenderung berlawanan dengan kadar TG. Hal yang sama dilaporkan oleh Tremblay *et al.* (2007) bahwa kadar TG yang tinggi berkorelasi dengan rendahnya konsentrasi kolesterol HDL.

Kadar Kolesterol LDL Rata-rata kadar kolesterol LDL kelinci sebelum perlakuan relatif kecil yaitu berkisar antara -3,84 mg/dL (P4) hingga 9,25 mg/dL (P5), seperti disajikan pada Tabel 7. Pemberian perlakuan selama dua bulan telah menaikkan kadar kolesterol LDL perlakuan P1 (K+) sebesar 163,08 mg/dL, namun tidak

berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Setelah percobaan berjalan dua bulan tampak bahwa pemberian 16,7 mg/kg/BB bubuk Cu-turunan klorofil (P3) cenderung lebih dapat menurunkan kadar kolesterol LDL dibanding P2, P4, dan P5.

Bila dihubungkan antara perubahan kadar KT (Tabel 2), dan kadar kolesterol LDL (Tabel 7), tampak ada konsistensi, semakin rendah peningkatan kadar KT, maka peningkatan kadar LDL kolesterol juga rendah. Terjadinya penghambatan peningkatan kadar kolesterol LDL ini, dapat diakibatkan karena meningkatnya kadar kolesterol HDL dalam serum, sehingga kelebihan kolesterol serum akan diangkut oleh kolesterol HDL masuk ke dalam hati, dan menggunakannya untuk membuat cairan empedu atau mendaurulangnya (Freeman dan Junge 2008).

Potensi Antiaterosklerosis Bubuk Ekstrak Cu-Turunan Klorofil

Rasio KT dengan Kolesterol HDL. Tujuan perhitungan rasio KT : kolesterol HDL adalah untuk mengetahui besarnya peluang (hewan Percobaan) mengalami risiko aterosklerosis. Pada Tabel 9 tampak bahwa pada 0 bulan penelitian, rasio KT: kolesterol HDL semua kelompok kelinci berkisar antara 1,37 : 1 – 1,98 : 1. Rasio terendah terjadi pada kelompok kelinci P1, dan tertinggi pada P3.0 Pengamatan 1 bulan berikutnya, umumnya terjadi peningkatan rasio KT: kolesterol HDL, dan yang tertinggi adalah kelompok P2 yaitu 3,20 : 1. Sedangkan kelompok kelinci yang mengalami penurunan rasio KT: kolesterol HDL adalah kelompok P4 yaitu 1,08:1.

Tabel 7 Rata-Rata Kadar Kolesterol LDL pada Awal, Satu, dan Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	Rata-rata kolesterol LDL (mg/dL) selama percobaan		
	Awal	Satu bulan	Dua bulan
P0 (K-)	3,45 ± 7,77 ^a	20,34 ± 19,39 ^a	5,51 ± 4,10 ^a
P1 (K+)	5,87 ± 4,70 ^a	31,12 ± 32,62 ^a	168,95 ± 123,63 ^a
P2	6,81 ± 9,07 ^a	85,03 ± 117,52 ^a	57,18 ± 75,48 ^a
P3	2,29 ± 7,069 ^a	78,00 ± 42,92 ^a	47,68 ± 38,93 ^a
P4	-3,84 ± 6,15 ^a	-1,29 ± 11,09 ^a	24,12 ± 16,82 ^a
P5	9,25 ± 18,00 ^a	54,04 ± 30,56 ^a	21,98 ± 10,14 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Tabel 8. Data Perubahan Kadar Kolesterol LDL Kelinci Setelah Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	n	Perubahan Kadar Kolesterol LDL (mg/dL)
P0 (K-)	3	2,06 ± 9,92 ^a
P1 (K+)	3	163,08 ± 118,99 ^a
P2	3	50,37 ± 69,47 ^a
P3	3	45,39 ± 45,87 ^a
P4	3	27,96 ± 18,58 ^a
P5	3	12,73 ± 20,85 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Pada akhir penelitian (2 bulan), kelompok kelinci P1 mempunyai nilai rasio KT: kolesterol HDL paling tinggi yaitu 7,49 : 1. Hal ini berarti bahwa kelompok P1 mempunyai resiko sangat tinggi untuk mengalami aterosklerosis dibanding kelompok kelinci lainnya. Rasio KT: kolesterol HDL yang dianjurkan adalah kurang dari 5 : 1, dengan rasio optimum sekitar 3 : 1 (AHA 2001). Anwar (2004) juga menekankan bahwa rasio KT: kolesterol HDL sebaiknya <4,6 pada laki-laki, dan < 4,0 pada perempuan. Makin tinggi rasio KT: kolesterol HDL maka risiko PJK juga semakin tinggi.

Lemieux *et al.* (2001) melaporkan bahwa rasio KT: kolesterol HDL lebih banyak digunakan untuk memprediksi resiko penyakit jantung iskemik (IHD) dari pada variasi rasio LDL: kolesterol HDL. Perhitungan rasio LDL: kolesterol HDL mempunyai perkiraan yang lebih rendah (*underestimate*) terhadap risiko IHD beberapa pasien dibandingkan dengan kualitas estimasi dari rasio KT: kolesterol HDL.

Penentuan Kadar MDA Hati Kelinci.

Penentuan kadar MDA hati diperlukan untuk mempelajari peran bubuk Cu-turunan klorofil dan bubuk klorofil lainnya dalam menghambat

terjadinya peroksidasi lipid. Bila konsentrasi MDA (hati) kelinci rendah, menunjukkan bahwa bubuk klorofil yang diberikan mampu menghambat terjadinya oksidasi lipid atau oksidasi kolesterol LDL di dalam tubuh.

Pada Tabel 10 tampak bahwa jenis ransum berpengaruh nyata terhadap kadar MDA kelinci, dimana perlakuan P1 memiliki kadar MDA tertinggi disusul P4. Kadar MDA P1 dan P4 tidak berbeda nyata, tapi berbeda nyata dengan P0, P2, P3, dan P5 ($p<0,05$). Pemberian Cu-turunan klorofil sebanyak 16,7 mg/kg BB (P3) lebih cenderung menurunkan kadar MDA dari pada P2, namun sedikit lebih tinggi dibanding P5. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Egner *et al.* (2001), bahwa klorofilin mampu menghambat terjadinya peroksidasi lipid.

Perlakuan P4 mempunyai kadar MDA relatif tinggi (tidak berbeda nyata dengan P1), padahal P4 mengandung klorofil dan Cu 3 kali lipat dari P3. Hal ini diduga karena konsentrasi Cu relatif tinggi sehingga diduga berubah menjadi prooksidan di dalam tubuh. Posmyk *et al.* (2008) menyatakan bahwa konsentrasi Cu^{2+} yang tinggi (2,5 mM) dapat menjadi pemicu terjadinya stres oksidatif dan meningkatkan kadar *thiobarbituric acid reactive substances* (TBARS) dalam jaringan. TBARS adalah merupakan salah satu indikator peroksidasi lipid yang paling awal digunakan dalam penelitian dengan subyek manusia maupun hewan percobaan (Winarsi, 2007).

Hasil penelitian yang relevan juga diungkapkan oleh Hamada (1995), bila kadar Cu^{2+} lebih besar dari 10 μM , maka Cu^{2+} bebas dapat berperan sebagai prooksidan. Akan tetapi bila kadar Cu^{2+} berkisar antara 2-4 μM dalam medium inkubasi, Cu^{2+} berperan secara nyata sebagai antioksidan.

Tabel 9. Rata-Rata Rasio Kadar Kolesterol Total: HDL pada Awal, Satu dan Dua Bulan Percobaan

Perlakuan	Rasio KT : kolesterol HDL		
	0 bulan	1 bulan	2 bulan
P0	2,02 ± 0,74	2,03 ± 0,65	1,70 ± 0,12
P1	1,37 ± 0,04	2,14 ± 0,130	7,82 ± 4,00
P2	1,49 ± 0,15	3,34 ± 3,00	3,01 ± 2,48
P3	2,04 ± 0,49	2,89 ± 0,99	2,73 ± 1,30
P4	1,46 ± 0,21	1,08 ± 0,18	2,03 ± 0,63
P5	1,93 ± 0,85	2,17 ± 0,92	2,04 ± 0,53

Tembaga berlebih dapat menurunkan aktivitas katalase, dan glutathionin reduktase, meningkatkan kadar peroksidasi lipid, dan menjadi pemicu munculnya lesi aterosklerosis. Namun aktivitas superoksida dismutase (SOD), askorbat peroksidase tidak dipengaruhi oleh tembaga berlebih (Chen dan Kao, 1999; Ghaffari dan Ghiasvand, 2006).

Tabel 10. Rata-Rata Kadar MDA Hati Kelinci Selama 2 Bulan Percobaan

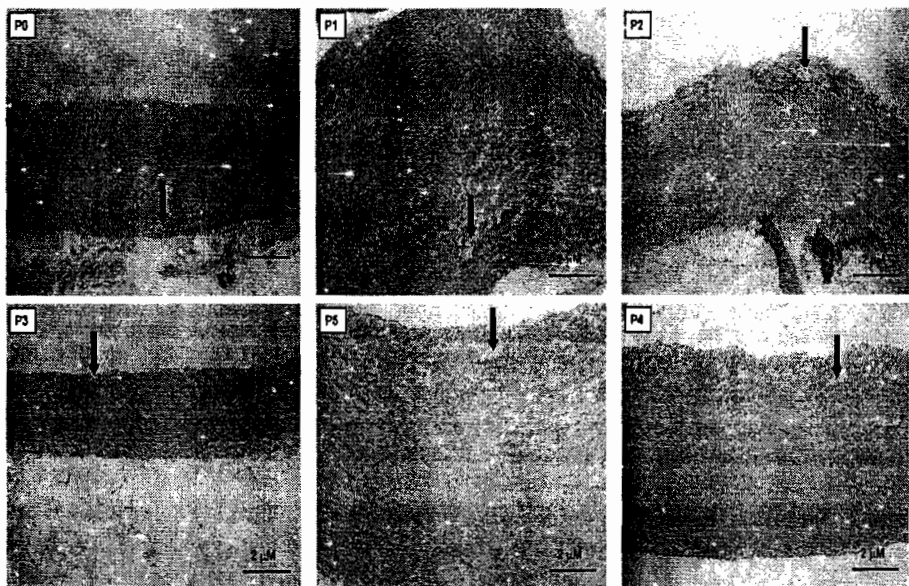
Perlakuan	n	Kadar MDA ($\mu\text{M/g}$)
P0 (K-)	3	41,51 \pm 7,44 ^a
P1 (K+)	3	72,31 \pm 15,18 ^b
P2	3	34,10 \pm 4,79 ^a
P3	3	32,31 \pm 7,77 ^a
P4	3	50,29 \pm 23,46 ^b
P5	3	26,10 \pm 9,40 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Keadaan Lesi Aterosklerosis pada Aorta Kelinci. Pemberian bubuk Cu-turunan klorofil pada pakan kelinci (pelet) dimaksudkan untuk

menekan/mencegah terjadinya lesi aterosklerosis pada aorta kelinci. Perlakuan kelinci yang diharapkan mengalami lesi aterosklerosis yang relatif parah adalah P1 (kontrol positif) dibanding perlakuan yang mengonsumsi pakan (mengandung bubuk Cu-turunan klorofil, klorofil alami, maupun yang komersial).

Namun hasil penelitian menunjukkan bahwa selama 2 bulan perlakuan, ternyata belum ditemukan plak ateromatosis yang jelas pada aorta, tetapi pada beberapa lokasi ditemukan akumulasi sel busa di tunika media. Jadi proses aterogenesis baru sampai tahap inisiasi sel busa derajat ringan, seperti tampak pada Gambar 1. Hal ini diduga karena lama penelitian yang relatif singkat dan atau kadar kolesterol yang terkandung dalam pakan relatif rendah (0,1%). Penetapan pemberian dosis 0,1% berdasarkan hasil penelitian Meijer *et al.* (1991), dimana dengan dosis tersebut telah dapat meningkatkan kadar KT darah sebanyak 835,9 mg/dL selama 7 minggu pengujian. Sedangkan dalam penelitian ini pengujian dilakukan selama 8 minggu, dan diharapkan akan terjadi pembentukan plak/lesi aterosklerosis.



Gambar 1. Sel Busa di Tunika Media pada Aorta Kelinci. Tanda Panah Menunjukkan Lokasi Akumulasi Sel Busa

Tahap inisiasi sel busa ini diamati pada lima bidang pandang pembuluh darah aorta di bagian tunika media. Jumlah sel busa yang terakumulasi di tunika media perbidang pandang disajikan pada Tabel 11.

Pada Tabel tersebut tampak jumlah sel busa yang ditemukan pada tunika media tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$) untuk semua perlakuan kelinci. Perlakuan P3 lebih cenderung untuk berpeluang tidak mengalami lesi aterosklerosis, dan sama halnya dengan P2, walaupun masih lebih tinggi dibanding P0. Perlakuan P1 paling berpeluang untuk mengalami lesi aterosklerosis dibanding perlakuan lainnya, dan P0 mengalami hal sebaliknya.

Tabel 11. Persentase Ditemukannya Sel Busa di Tunika Media Perbidang Pandang

Perlakuan	Ditemukannya sel busa di tunika media perbidang pandang (%)
P0	20,00 ± 20,00 ^a
P1	53,33 ± 23,09 ^a
P2	26,67 ± 30,55 ^a
P3	26,67 ± 11,55 ^a
P4	40,00 ± 20,00 ^a
P5	33,33 ± 30,55 ^a

Angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha=0,05$

Tahap inisiasi sel busa ini ditemukan pada beberapa lokasi di tunika media dengan lima bidang pandang. Jumlah persentase terjadinya sel busa di tunika media perbidang pandang disajikan pada Tabel 11. Dari Tabel tersebut tampak jumlah sel busa yang ditemukan pada tunika media tidak berbeda nyata ($\alpha=0,05$) untuk semua perlakuan kelinci.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Pemberian bubuk ekstrak Cu-turunan klorofil sebanyak 16,7 mg/kg BB/hari cenderung lebih mampu menekan peningkatan KT, TG, kolesterol LDL, dan sekaligus dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL kelinci setelah percobaan berlangsung dua bulan, dibandingkan klorofil alami.
2. Pemberian bubuk ekstrak Cu-turunan klorofil sebanyak 16,7 mg/kg BB/hari (P3)

cenderung lebih berpotensi untuk mencegah pembentukan lesi aterosklerosis dibanding klorofil alami, maupun bubuk klorofil komersial. Hal ini diindikasikan oleh kemampuannya dalam menekan peningkatan KT (hingga 120,72 mg/dL), TG (hingga 121,01 mg/dL), kolesterol LDL (hingga 117,69 mg/dL), kadar MDA (hingga 40 μ M/g), rasio KT: kolesterol HDL hingga 5,76 poin), dan sekaligus dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL (hingga 21,17 mg/dL) setelah percobaan berlangsung dua bulan. Hal ini diperkuat juga oleh banyaknya sel busa ditemukan di tunika media dalam satu bidang pandang, walaupun tidak berbeda nyata dengan bubuk klorofil alami. Jadi semakin banyak sel busa, kecenderungan pembentukan plak semakin tinggi.

Saran

Perlu penelitian lanjutan tentang perpanjangan waktu intervensi pemberian bubuk Cu-turunan klorofil menjadi 3 bulan (dengan konsentrasi kolesterol pakan sebesar 0,1%), atau menjadi 2 bulan dengan konsentrasi kolesterol pakan lebih besar yaitu sekitar 0,2%. Selanjutnya perlu kajian lanjutan mengenai toksikologi akut, maupun kronik, uji klinis sebelum bubuk Cu-turunan klorofil diolah menjadi pangan fungsional secara komersial.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sekretariat Badan Litbang Pertanian Departemen Pertanian RI atas dana penelitian yang diberikan melalui Program KKP3T dengan No.Kontrak: 723/LB.620/1.1/3/2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Alsuhendra. 2004. *Daya Anti-aterosklerosis Zn-Turunan Klorofil dari Daun Singkong (Manihot esculenta Crantz) pada Kelinci Percobaan* [Disertasi]. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- American Heart Association. 2001. *Cholesterol dalam* <http://www.amhrt.org>

- Anwar, TB. 2004. *Manfaat Diet pada Penanggulangan Hiperkolesterolemi*, Makalah Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.
- Canjura, FL, RH. Watkins, Schwartz. 1999. Color improvement and metallo-chlorophyll complexes in continuous flow aseptically processed peas. *J. I of Food Sci.* 64 (6): 987-990.
- Cheng KL, K. Ueno, T. Imamura. 1982. *Handbook of Organic Analytical Reagents*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Egner PA, JB. Wang, YR. Zhu, BC. Zhang, Wu Y, Zhang QN, Qian GS, Kuang SY, Gange SJ, Jacobson LP, Helzlsouer KJ, Balley GS, Groopman JD, Kensler JW. 2001. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *PNAS* Vol.98 No.25: 14601-14606
- Endo YR. Usuki, dan T. Kaneda. 1985. Antioxidant effects of chlorophyll and pheophytin on the autooxidation of oils in the dark. II. The mechanism of antioxidative action of chlorophyll. *JAOCS* 62: 1387 - 1390.
- Ferruzzi MG, Failla ML, Schwartz SJ. 2001. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoid and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and caco-2 human cell Model. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2082-2089.
- Ferruzzi MG, Bohm V, Courtney PD. Schwartz SJ. 2006. Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *J. Food Science* 67: 2589-2595 [Abstract].
- Freeman, MW, C. Junge. 2008. Kolesterol Rendah Jaantung Sehat. Joeliani LE, penerjemah; Simatupang A, editor. Jakarta: PT Bhuana Ilmu Populer. Terjemahan dari: *Lowering Your Cholesterol*.
- Ghaffari, MA, T. Ghiasvand. 2006. Effect of Lycopene on Formation of Low Density Lipoprotein-Copper Complex in Copper Catalyzed Peroxidation of Low Density Lipoprotein, as in vitro Experiment. *Iranian Biomedical Journal* 10 (4): 191-196
- Gross J. 1991. *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Hamada, T. 1995. Antioxidant and prooxidant roles of copper in Tween 20-induced hemolysis of hamster and pig erythrocytes containing marginal vitamin E. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) Volume 51, Number 6*.
- Jensen, GS, DI. Ginsberg, C. Drapeau. 2001. Blue-Green Algae as an Immuno-Enhancer and Biomodulator. *JANA* 3(4): 24-30.
- Lemieux, I, B. Lamarche, C. Couillard, A. Pascot, B. Cantin, J. Bergeron, GR. Dagenais, JP. Després. 2001. Total Cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL Cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in Men. *Arch Intern Med.* 161:2685-2692.
- Kotani, M, Yamauchi N, Ueda Y, Imahori Y, Chachin K. 1999. Chlorophyll Degradation in Boiled Broccoli Florets during Storage in the Light. *Food Science and Technology Research*. Vol. 5, No. 1: pp.35-38
- Kusharto, CM, I. Tanzaha, M. Januwati. 2008. Produk Ekstrak Klorofil dari Berbagai Daun Tanaman Untuk Meningkatkan Respon Imun dan Aplikasinya sebagai Anti-Aterosklerosis. Laporan Penelitian LPPM IPB Bogor
- Marquez, UML, RMC. Barros, P. Sinnecker. 2005. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International* 38: 885-891.
- Meijer, GW. et al. 1991. *LDL Turnover and LDL-Receptor*. In Meijer GW. Cholesterol Metabolism in Inbred Rabbits with Low or High Cholesterolemic Response to Dietary Cholesterol Characterization of An Animal Model. University of Utrecht, Netherlands.
- Posmyk, MM, R. Kontek, KM. Janas. 2008. Antioxidant enzymes activity and phenolic

- compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. Department of Ecophysiology and Plant Development, University of Lodz, Banacha. *dalam* <http://www.sciencedireKT.com/science?>
- Steel, RGD, JH. Torrie. 1993. *Prinsip dan Prosedur Statistika, suatu pendekatan biometrik*. Jakarta: PT.Gramedia Pustaka Utama.
- Tremblay, AJ, AD. Sniderman, C. Gagné, Bergeron J. Couture P. 2007. Differential impact of plasma triglycerides on HDL-cholesterol and HDL-apo A-I in a large cohort. *j.clinbiochem*. Volume 40, Issues 1-2: 25-29
- Von Elbe, JH, AS. Huang, EL. Attoe, WK. Nank. 1986. Pigmen composition and color of conventional and Veri-Green canned. *J.Agric. Food Chem.* 34 (1): 52-54.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami & Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius