

Eksplorasi Tumbuhan Obat Hutan Berkhasiat Inhibitor HMG-KoA Reduktase

(Exploration of Medicinal Forest Plants with HMG-CoA Reductase Inhibitory Activity)

Sulistiyani^{1,2*}, Rita K Sari^{1,3}, Wulan Triwahyuni^{1,4}

¹ Pusat Studi Biofarmaka-LPPM IPB, Jl. Taman Kencana No. 3 Bogor

² Departemen Biokimia FMIPA IPB, Jl Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor

³ Departemen Hasil Hutan FAHUTAN IPB, Kampus IPB Dramaga Bogor

⁴ Departemen Kimia FMIPA IPB, Jl. Agatis Kampus IPB Dramaga Bogor

*Penulis korespondensi: sulistiyani@apps.ipb.ac.id

Abstract

Five medicinal forest plants are potential candidates to be developed as cholesterol-reducing herbal product. The objective of this research is to explore the potency of the leaf of pulai ((*Alstonia scholaris*, R.Br), jabon merah (*Antocephalus macrophyllus*), jati belanda (*Guazuma ulmifolia*), mindi (*Melia azedarach*), and surian (*Toona sinensis*) based on their main secondary metabolic contents and to study their activity as HMG-CoA reductase inhibitor, an enzyme key in the regulation of cholesterol biosynthesis. Dried leaves materials were prepared from the each plant by standard procedure and their phytochemicals contents were determined qualitatively. Subsequently, flavonoid fractions from the leaves of all five plants were prepared, and alkaloid fraction was prepared from the leaf of pulai only. The flavonoid content was determined using quercetin as standard. The effect of each samples on the HMG-CoA reductase activity were analyzed using HMGR in vitro assay kit. At concentration of 20 ppm jati belanda leaf extract, however, showed the highest inhibitory activity which was similar to quercetin (5 ppm) as well as pravastatin control inhibitor. Further analysis showed that extracts from leaves of all plants tested were shown to inhibit the HMG-CoA reductase with IC₅₀ values ranging from 7.53 to 52.62 ppm.

Keywords: *HMG-KoA reductase inhibitor, in vitro assay, medicinal forest plant exploration*

Abstrak

Terdapat lima tumbuhan hutan yang berpotensi dikembangkan sebagai produk antikolesterol, tetapi informasi ilmiah terkait mekanisme kerja zat aktifnya masih terbatas. Tujuan penelitian ini mengeksplorasi potensi daun pulai ((*Alstonia scholaris*, R.Br), jabon merah (*Antocephalus macrophyllus*), jati belanda (*Guazuma ulmifolia*), mindi (*Melia azedarach*), dan surian (*Toona sinensis*) berdasarkan kandungan senyawa metabolit sekunder utamanya dan mengkaji aktivitasnya sebagai inhibitor HMGKoA reduktase, yaitu enzim yang berperan dalam regulasi sintesis kolesterol. Simplisia dari daun tumbuhan uji disiapkan dengan prosedur yang memenuhi parameter baku mutu. Selanjutnya kandungan fitokimia ditetapkan dengan analisis kualitatif. Aktivitas HMG-KoA reduktase dilakukan secara *in vitro* menggunakan kit HMGR Assay. Dari kelima macam ekstrak tumbuhan yang diuji, fraksi flavonoid daun jati belanda pada konsentrasi 20 ppm mampu menekan aktivitas enzim sama baiknya dengan kontrol inhibitor pravastatin dan kuersetin 5 ppm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari daun semua tumbuhan yang diuji mampu menghambat HMGKoA reduktase secara *in vitro* dengan indeks penghambatan (IC₅₀) berkisar antara 7,93-52,62 ppm.

Kata kunci: *asai in vitro, eksplorasi tumbuhan obat hutan, inhibitor HMG-KoA reduktase*

Pendahuluan

Kematian akibat penyakit kardiovaskular di dunia dilaporkan mencapai 17,5 juta orang pada tahun 2012 (WHO 2016). Sementara itu, hasil Riset Kesehatan Dasar baru-baru ini (Kemenkes 2013) menunjukkan bahwa dari berbagai penyakit degeneratif, maka penyakit kardiovaskular, khususnya penyakit jantung koroner (PJK) dan stroke masih menduduki peringkat pertama penyebab kematian di kota-kota besar di Indonesia. Salah satu faktor risiko primer untuk terjadinya kelainan patologis dalam PJK (aterosklerosis) ialah kondisi dislipidemia, yaitu ditandai oleh konsentrasi lipid darah yang di atas normal. Beberapa kajian klinis menunjukkan bahwa penggunaan obat yang dapat menurunkan konsentrasi kolesterol total ternyata memperbaiki kondisi pasien PJK dan memperpanjang harapan hidupnya (LRCP 1984, HHS 1987).

Obat penurun kolesterol yang dianggap sebagai “*first-line therapy*” adalah kelompok statin, yakni yang berkhasiat sebagai penghambat enzim 3-hidroksi-3-metilglutaril (HMG)KoA reduktase (Rosenson 2004), namun penggunaannya dalam jangka panjang berpotensi menimbulkan efek samping. Efek samping antara lain adalah timbulnya gangguan fungsi hati ditunjukkan dengan meningkatnya kadar SGPT dan SGOT, atau terjadi peningkatan tekanan darah (Marinetti 1990). Oleh karena itu, pengembangan obat yang sama khasiatnya namun dengan efek samping yang minimum masih perlu terus diupayakan melalui eksplorasi sumber daya alam Indonesia, khususnya tumbuhan hutan.

Sekitar 30000 tumbuhan diperkirakan terdapat di dalam hutan hujan tropika

dan sebagian besar diantaranya berkhasiat sebagai obat, tetapi baru sekitar 180 spesies yang digunakan untuk berbagai keperluan industri, obat dan jamu (Supriadi 2001). Di Indonesia terdapat berbagai tanaman hutan dengan kandungan metabolit sekunder yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai produk antikolesterol dan belum banyak dieksplorasi. Di dalam pengembangannya, masih sedikit produk antikolesterol yang didukung oleh informasi ilmiah terkait mekanisme kerja zat aktifnya; salah satunya adalah yang berbasis mekanisme penghambatan enzim HMGKoA reduktase (inhibitor HMGKoA reduktase). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mengeksplorasi beberapa tumbuhan hutan potensial dengan khasiat sebagai inhibitor HMGKoA reduktase yaitu: pulai atau disebut juga dengan kayu gabus (*Alstonia scholaris*, R.Br), jabon merah (*Antocephalus cadamba*), jati belanda (*Guazuma ulmifolia*), mindi (*Melia azedarach*), dan surian (*Toona sinensis*).

Pulai yang banyak tumbuh di hutan jati atau hutan di pedesaan, telah dimanfaatkan secara tradisional terutama kulit kayunya untuk pengobatan berbagai penyakit infeksius dan non-infeksius (Supriadi 2001). Berbagai metabolit sekunder yang terkandung dalam kayu pulai antara lain ialah senyawa yang termasuk golongan alkaloid, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, dan flavonoid. Menurut Usman (2000), potensi antihiperkolesterolemia kulit batang pulai terdapat dalam fraksi kloroform dan fraksi air.

Tumbuhan jati belanda yang tumbuh di hutan di Pulau Jawa dan Madura, terutama daunnya sering digunakan sebagai komponen “jamu galian singset” karena dikenal sebagai pelangsing tradisional. Potensi ekstrak daun jati

belanda dalam pencegahan aterosklerosis eksperimental dan sebagai antihiperlipidemia telah diteliti (Sulistiyani *et al.* 2003).

Di Indonesia, jabon merah yang dikenal sebagai kelempayan adalah jenis pohon yang kini banyak ditanam sebagai tanaman hutan rakyat, tetapi pemanfaatannya di tengah masyarakat sebagai obat tradisional belum banyak dilaporkan. Penelitian khasiat jabon putih sebagai penurun lipid darah dilaporkan oleh Kumar *et al.* (2008). Pemberian ekstrak akar jabon putih sebanyak 500 mg kg⁻¹ BB dalam penelitian tersebut menurunkan lipid (kolesterol, trigliserida, fosfolipid) darah tikus hiperlipidemic sebesar 22-23%. Sari *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak metanol kulit jabon putih memiliki aktivitas antiproliferasi sel kanker serviks HeLa (IC₅₀ 3 µg ml⁻¹).

Adapun penelitian terkait khasiat tumbuhan mindi menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun mindi bersifat antioksidan (Orhan *et al.* 2011) dan ekstrak metanol kulit mindi yang berasal dari Thailand bersifat sangat aktif berdasarkan uji *Bhrine Shrimp Lethality Test* (BSLT) dengan nilai LC₅₀ 3,27 µg ml⁻¹ (Pissutthanan *et al.* 2004). Namun penelusuran pustaka mengenai penelitian potensi senyawa antikolesterol yang terkandung dalam tumbuhan mindi yang tumbuh di Indonesia belum ditemukan.

Kulit kayu surian digunakan sebagai *astringent* dan *depurative*, sedangkan bagian akar digunakan sebagai penyegar dan diuretic di Cina, (Edmonds & Staniford 1998). Penelusuran pustaka menunjukkan bahwa bagian daun surian mengandung senyawa aktif yang bersifat antioksidan dan antiproliferasi sel kanker paru, sel kanker ovarium, dan sel kanker prostat (Chang *et al.* 2002, Chia *et al.*

2007, Wang *et al.* 2007, Hseu *et al.* 2008).

Bahan dan Metode

Penyiapan dan penentuan mutu simplisia

Bahan berupa daun pulai, jabon merah, jati belanda, mindi, dan surian diperoleh dari koleksi tanaman hutan Litbang Kementerian Kehutanan Bogor dan telah diidentifikasi kebenaran jenis pohonnya oleh Herbarium Bogoriense bidang Botani Pusat Penelitian Biologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong Bogor. Lima jenis sampel daun tersebut diambil menggunakan prosedur WHO (1998). Sampel kemudian dikeringkan pada suhu 50 °C hingga kadar air maksimum 10%. Masing-masing daun kering kemudian dihaluskan dengan cara digerus dan kemudian diayak dengan saringan berukuran 40 mesh.

Parameter yang digunakan untuk menentukan mutu simplisia adalah kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan kandungan kualitatif fitokimianya yang meliputi alkaloid, flavonoid/fenolik, tanin, saponin, dan steroid/terpenoid. Penetapan kadar air dan kadar abu simplisia dilakukan dengan menggunakan prinsip gravimetri yang mengacu kepada Depkes (2000). Kadar abu tidak larut asam ditetapkan dengan cara melarutkan abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu dalam 25 ml HCl 10% dan dididihkan selama 5 menit. Berikutnya larutan disaring, dibilas dengan air suling sampai bebas klorida. Kandungan fitokimia ditentukan secara kualitatif menggunakan pereaksi kimia spesifik yang akan mendeteksi keberadaan senyawa-senyawa: flavonoid, fenolik,

tanin, saponin, alkaloid, steroid, dan terpenoid (Harborne 1998).

Penyiapan fraksi flavonoid

Berdasarkan hasil analisis fitokimia, maka dilakukan fraksinasi untuk memperoleh metabolit sekunder flavonoid terhadap kelima jenis daun dan fraksinasi alkaloid hanya terhadap daun pulai. Fraksinasi flavonoid dilakukan menurut metode Markham (1988). Secara ringkas, simplisia diekstraksi secara maserasi dengan metanol:air (9:1). Setelah penyaringan filtrat, residu dimaserasi ulang dengan metanol:air (1:1). Hasil penyaringan filtrat pada maserasi kedua digabungkan dengan filtrat hasil maserasi metanol:air (9:1), dipekatkan dengan evaporator berputar hingga tersisa sepersepuluh dari volume awal. Filtrat pekat ini selanjutnya dipartisi dengan heksana (3x10 ml). Fraksi metanol-air kemudian dipartisi lebih lanjut menggunakan kloroform (3x10 ml). Fraksi metanol-air hasil partisi tersebut dipekatkan dengan evaporator berputar sehingga diperoleh fraksi flavonoid.

Ada pun fraksinasi untuk memperoleh alkaloid dilakukan menurut metode Harborne (1998). Ekstrak kasar dihilangkan senyawa lipidnya dengan pelarut heksana menggunakan metode soklet. Residu bebas lemak kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol dan selanjutnya diasamkan. Terbentuk endapan tidak larut asam dan lapisan air asam yang kemudian ditambahkan basa lalu dipartisi dengan kloroform menghasilkan fraksi kloroform (fraksi non polar/alkaloid A) dan fraksi air. Fraksi air kemudian ditambahkan HCl, lalu diendapkan hingga diperoleh fraksi polar/alkaloid B).

Uji daya hambat HMG-KoA reduktase.

Uji ini menggunakan kit HMGR (Sigma-Aldrich, Catalog No. CS1090) yang terdiri atas larutan buffer, NADPH, substrat (HMG-KoA), dan enzim yang mengandung domain katalitik enzim HMG-KoA reduktase (0,5-0,7 mg ml⁻¹) serta pravastatin sebagai inhibitor. Fraksi flavonoid tumbuhan (100 ppm) dilarutkan dalam air dengan cara sonikasi. Selanjutnya, semua sampel dan kontrol inhibitor (pravastatin) pada konsentrasi yang ditetapkan, dimasukkan ke dalam UV 96-well *microplate* dengan volume alikuot 1 µl. Sebagai pembanding digunakan kuersetin 5 ppm (Wako Chemicals). Selanjutnya, sejumlah larutan buffer asai ditambahkan ke dalam alikuot sehingga volume akhir 200 µl. Setelah itu, berturut-turut kepada larutan kontrol enzim, semua sampel, larutan kontrol inhibitor, larutan pembanding kuersetin dan blanko ditambahkan: larutan NADPH (4 µl), substrat HMG-KoA (12 µl) dan terakhir enzim HMG-KoA reduktase (2 µl). Daya hambat sampel terhadap aktivitas enzim HMG-KoA diukur segera dengan spektrofotometer *Micro-plate/ELISA Reader* UV/Vis setiap 10 detik selama 10 menit pada $\lambda=340$ nm dan suhu 37 °C.

Penentuan kadar senyawa penciri fraksi (Depkes 2000)

Fraksi flavonoid dari contoh tumbuhan yang diuji ditentukan kadar flavonoid totalnya secara kuantitatif dengan metoda spektrofotometri (Harborne 1998). Sampel (0,2 g) dicampur dengan 1 ml HMT, 20 ml aseton, dan 2 ml HCl 25%, selanjutnya direfluks selama 30 menit. Filtratnya disaring dan ditera dalam labu takar 100 ml menggunakan aseton, dan selanjutnya dimasukkan dalam corong pisah yang telah

ditambahkan akuades dalam volume yang sama. Campuran tersebut diekstraksi dengan etil asetat (3 x 15 ml), fraksi etil asetat yang terkumpul ditera hingga 50 ml. Sebanyak 10 ml fraksi etil asetat tadi ditambahi 1 ml AlCl_3 dan ditera hingga 25 ml dengan asam asetat glasial, didiamkan dalam suhu ruang selama 30 menit. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada $\lambda=425$ nm. Kuersetin digunakan sebagai standar dalam penentuan kandungan flavonoid.

Hasil dan Pembahasan

Parameter baku mutu simplisia

Simplisia sebagai bahan baku obat harus memenuhi standar mutu yang tercantum dalam monografi terbitan resmi Kementerian Kesehatan RI, yaitu Materna Medika Indonesia dan Farmakope Herbal Indonesia. Akan tetapi, penelusuran pustaka menunjukkan bahwa hanya daun jati belanda yang tercantum dalam Materna Medika Indonesia (Depkes 1989) dan Farmakope Herbal Indonesia (Kemenkes 2009). Hal ini disebabkan daun mindi, surian, jabon, dan pulai belum termasuk ke dalam bahan baku obat yang sudah banyak digunakan. Namun demikian, oleh karena kelima simplisia tersebut sedang diteliti dan dikaji prospeknya sebagai bahan baku obat, maka penelitian ini melaporkan karakteristik kelima jenis simplisia daun sesuai dengan beberapa parameter persyaratan mutu farmakope seperti kebenaran jenis (identifikasi spesies tumbuhan), kadar air, kadar abu, dan deteksi kandungan fitokimia secara kualitatif.

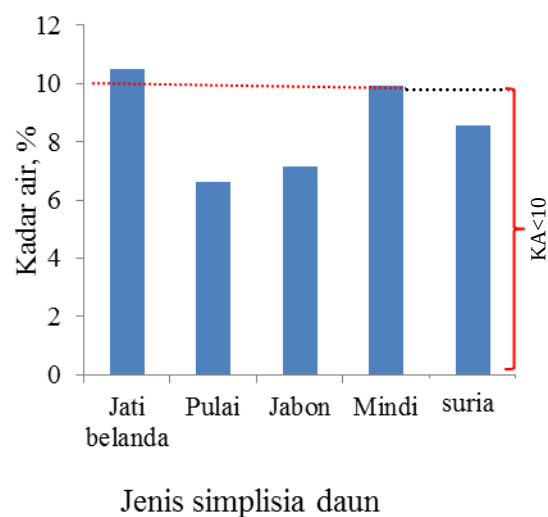
Kadar air

Kadar air kelima jenis simplisia daun beragam (Gambar 1) yang disebabkan

oleh jenis daun dan proses pengeringan. Daun dengan ketebalan yang berbeda yang dikeringkan dengan jenis dan waktu pengeringan yang sama menghasilkan simplisia dengan kadar air yang berbeda. Data menunjukkan bahwa kecuali jati belanda, keempat jenis simplisia seperti pulai, jabon, mindi dan surian memenuhi persyaratan mutu kadar air. Kadar air minimal simplisia ditetapkan dengan tujuan untuk menghindari berkembangbiaknya mikroorganisme seperti kapang yang dapat mempengaruhi bioaktivitasnya dalam masa penyimpanan (Mutiatikum *et al.* 2010).

Kadar abu

Kadar abu total dan kadar abu tak larut asam kelima jenis simplisia juga beragam (Tabel 1). Keragaman kadar abu dipengaruhi oleh faktor genetik, tempat tumbuh, cara panen, pasca panen, dan preparasi akhir simplisia (Mutiatikum *et al.* 2010).



Gambar 1 Kadar air lima jenis simplisia daun.

Tabel 1 Kadar abu simplisia

Jenis simplisia	Kadar abu total, %	Kadar abu tak larut asam, %
Jati belanda	10,26	0,80
Pulai	9,87	0,50
Jabon	10,11	0,73
Mindi	8,22	0,15
Surian	11,48	1,20

Oleh karena faktor genetik ditiadakan, maka kadar abu yang dipersyaratkan Farmakope Herbal Indonesia berbeda diantara jenis herbal.

Seperti contohnya pada simplisia daun pegagan, kadar abu total dan kadar abu tak larut asam yang dipersyaratkan adalah $\leq 18,5$ dan $\leq 4,9\%$, sedangkan kadar abu total simplisia daun salam harus $\leq 5,5$ dan $\leq 1,8\%$ (Kemenkes 2009). Menurut Kemenkes (2009), kadar abu total simplisia daun jati belanda yang dipersyaratkan adalah $\leq 7,2\%$. Akan tetapi, dalam penelitian ini kadarnya sebesar 10,26%, yang lebih tinggi dari persyaratan mutu tersebut. Perbedaan tersebut dapat terjadi karena tempat tumbuh pohon jati belanda mengandung mineral dengan konsentrasi tinggi. Hal ini dibuktikan oleh penelitian Mutiatikum *et al.* (2010), bahwa kadar abu total daun miana yang berasal dari Manado, Kupang, dan Papua beragam yaitu berturut-turut 11,5; 16,6; dan 9,4%.

Kandungan fitokimia

Hasil analisis secara kualitatif menunjukkan bahwa kelima simplisia terdeteksi mengandung flavonoid, fenolik, saponin, tanin, dan steroid dengan intensitas yang beragam (Tabel 2). Akan tetapi hanya simplisia daun pulai yang terdeteksi mengandung alkaloid dan keempat simplisia lainnya tidak mengandung alkaloid.

Terdeteksinya alkaloid dalam simplisia daun pulai konsisten dengan laporan Yamauchi *et al.* (1990). Kelima ekstrak tidak terdeteksi mengandung terpenoid.

Flavonoid yang terdeteksi kuat dalam simplisia daun pulai dan surian dan terdeteksi sedang dalam simplisia jabon serta terdeteksi lemah dalam simplisia daun mindi dapat berperan sebagai inhibitor HMGCoA reduktase. Flavonoid dari golongan isoflavon seperti genistein, daidzein, dan glisitein yang diisolasi dari kedelai dilaporkan mampu menghambat kerja enzim HMGCoA reduktase (Sung *et al.* 2004). Iqbal *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak kulit terlarut air dan ekstrak daun terlarut metanol dari *Ficus palmata* dengan kadar fenol total 255,8 dan 203 μg (asam galat equivalen (GAE) mg^{-1} ekstrak mampu menghambat kerja enzim HMGCoA reduktase dengan nilai IC_{50} 9,1 dan 65 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Dalam penelitian tersebut, pravastatin sebagai kontrol positif memiliki nilai IC_{50} 70,25 nM.

Saponin terdeteksi pada kelima jenis simplisia. Saponin dapat juga berperan menghambat kerja enzim, contohnya adalah diosgenin suatu furostanol saponin yang mampu menghambat kerja enzim HMGCoA reduktase (Raju & Bird 2007).

Tabel 2 Fitokimia lima jenis simplisia berdasarkan uji fitokimia secara kualitatif

Uji	Pulai	Jabon	Mindi	Surian	Jati belanda
Flavonoid	+++	++	+	+++	++
Fenolik	++	+++	+	++	+
Alkaloid	+	-	-	-	-
Saponin	++	+	+++	+++	+
Tanin	+	+	+	++	+

Keterangan: tanda dalam kolom seperti ++++ : terdeteksi sangat kuat, +++: kuat, ++: sedang, +: lemah, -: tidak terdeteksi

Tanin yang terdeteksi pada kelima jenis simplisia dapat menghambat penyerapan lemak di usus dengan cara bereaksi dengan protein mukosa dan sel epitel usus. Tanin terhidrolisis golongan gallotanin yang terbentuk dari asam galat/asam tanin terbukti sebagai inhibitor HMGKoA reduktase karena mampu menurunkan HMGKoA hingga dua kali lipat dari HMGKoA kontrol (Do *et al.* 2011).

Karakteristik ekstrak dan penentuan senyawa penciri ekstrak

Hasil ekstraksi lima jenis simplisia daun dengan metode maserasi dalam etanol teknis (1:10) selama 24 jam menghasilkan ekstrak kasar dengan rendemen beragam (Tabel 3). Ekstraksi daun surian menghasilkan ekstrak dengan rendemen tertinggi, kemudian diikuti oleh berturut-turut oleh rendemen ekstrak jabon, pulai, mindi, dan jati belanda. Rendemen ekstraksi kelima jenis daun ini tergolong tinggi karena > 4% (Syafii *et al.* 2014). Tingginya rendemen ekstrak dapat disebabkan oleh senyawa klorofil daun yang ikut terekstraksi oleh etanol. Harborne (1998) menyatakan bahwa klorofil dapat larut dalam pelarut organik seperti etanol, aseton, dan metanol.

Rendemen ekstraksi surian dari penelitian ini (31,24%) lebih tinggi dibandingkan rendemen ekstraksi surian hasil penelitian Sari *et al.* (2011), yaitu 13,11%. Perbedaan tersebut terjadi karena metode ekstraksi dan konsentrasi etanol, tempat tumbuh, dan kondisi daun yang digunakan berbeda. Penelitian Sari *et al.* (2011) menggunakan metode sokletasi selama 12 jam dalam pelarut etanol 96%. Daun suriannya berasal dari Hutan Pendidikan Gunung Walat dan daun yang diekstraksi tidak membedakan daun yang muda maupun tuanya.

Menurut Kemenkes (2009), rendemen minimal ekstraksi daun jati belanda adalah 9,2% dengan kandungan flavonoid minimal 3,0 mg kuersetin g⁻¹ ekstrak. Hasil ekstraksi penelitian ini memenuhi persyaratan rendemen yang ditetapkan Kemenkes (2009), tetapi kandungan flavonoid totalnya jauh lebih rendah. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh jenis pelarut yang digunakan yaitu metanol. Kadar flavonoid total yang dipersyaratkan Kemenkes (2009) ditetapkan dari ekstrak hasil ekstraksi dengan etanol 100%, sedangkan dalam penelitian ini menggunakan metanol/air dengan nisbah 9:1.

Tabel 3 Rendemen dan kandungan flavonoid total lima jenis ekstrak daun

Jenis ekstrak	Rendemen, %	Flavonoid total, mg kuersetin g ⁻¹ ekstrak
Surian	31,24	1,43
Pulai	25,73	1,40
Mindi	24,45	1,05
Jabon	29,23	0,55
Jati Belanda	12,60	0,42

Asai aktivitas enzim HMGKoA reduktase in vitro

Enzim HMGKoA reduktase adalah enzim kunci dalam pengaturan metabolisme dan produksi kolesterol di organ hati, lebih tepatnya pada lintasan mevalonat, yakni lintasan metabolik yang menghasilkan kolesterol dan senyawa isoprenoid lainnya (Goldstein & Brown 1990) Enzim ini mengatalisis reaksi reduksi HMGKoA menjadi mevalonat dan Koenzim A dengan cara mengoksidasi koenzim NADPH menjadi NADP⁺ (Holdgate *et al.* 2003) Laju reaksi oksidasi NADPH inilah yang pada asai in vitro diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda=340$ nm. Penghambatan terhadap aktivitas enzim akan menyebabkan menurunnya laju oksidasi NADPH.

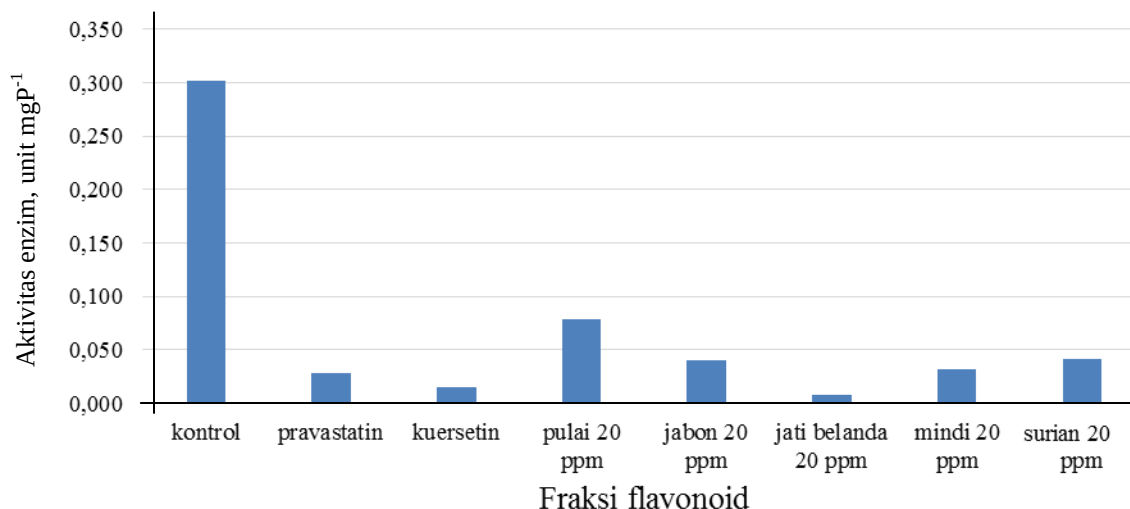
Data menunjukkan bahwa aktivitas enzim menurun signifikan dengan penambahan pravastatin (*Pravachol*) sebagai inhibitor komersil dibandingkan dengan kontrol enzim (Gambar 2). Dalam percobaan ini, pravastatin menghambat aktivitas enzim hingga 90,73% (Tabel 4). Hal ini menunjukkan bahwa sistem asai berjalan baik. Pravastatin, yaitu senyawa turunan mevastatin dan masih tergolong sama dengan lovastatin, dilaporkan dapat

menurunkan 20-30% konsentrasi kolesterol penderita hiperkolesterolemia (Raasch 1991). Senyawa kelompok statin banyak digunakan dalam pengelolaan dan pencegahan penyakit kardiovaskular pada pasien penderita hiperkolesterolemia (Pettreta *et al.* 2010).

Pengujian terhadap fraksi flavonoid murni/tunggal kuersetin (5 ppm) menunjukkan bahwa senyawa ini mampu memberikan penghambatan terhadap aktivitas enzim sama atau bahkan sedikit lebih baik daripada inhibitor pravastatin. Hal ini konsisten dengan laporan Lee *et al.* (2004) yang melaporkan kuersetin sebagai komponen yang bertanggung jawab dalam aktivitas penghambatan HM-KoA reduktase oleh tumbuhan hutan *Allium victorialis*.

Tabel 4 Daya hambat fraksi flavonoid (20 ppm) terhadap HMG-KoA reduktase

Sampel	Daya hambat, %
Pravastatin	90,73
Kuersetin	95,16
Pulai	73,79
Jabon	86,69
Jati Belanda	97,45
Mindi	89,38
Surian	86,29



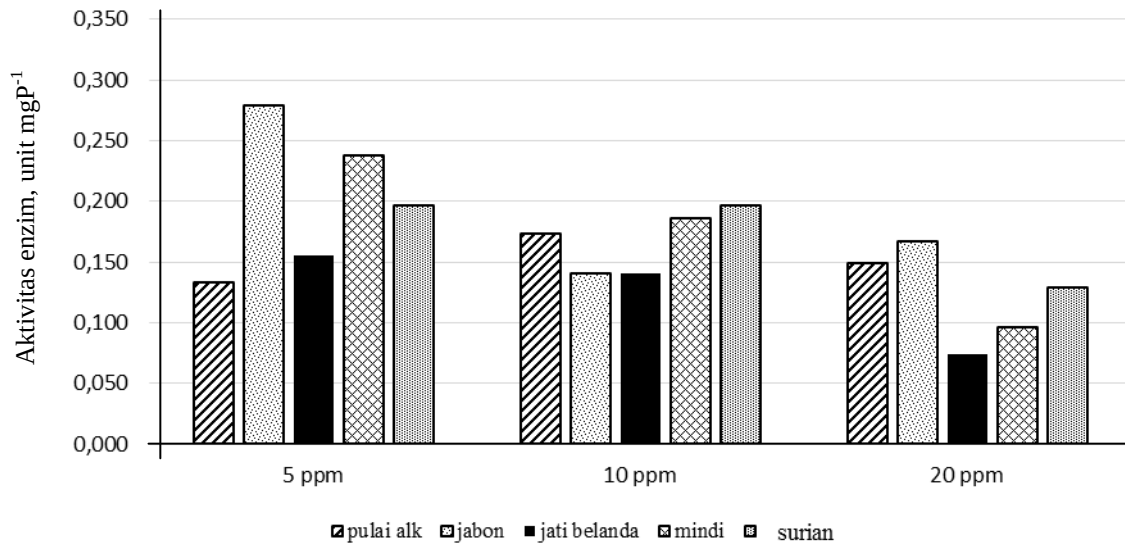
Gambar 2 Aktivitas enzim dengan/tanpa penambahan fraksi flavonoid.

Adapun pengujian terhadap kelima macam fraksi flavonoid (masing-masing masih merupakan kumpulan dari beragam fraksi flavonoid) pada konsentrasi sama, yaitu 20 ppm, memperlihatkan bahwa fraksi jati belanda menunjukkan penghambatan terbesar dan potensi yang relatif sama dengan pravastatin dan kuersetin. Penghambatan terhadap aktivitas enzim oleh fraksi flavonoid dari empat tumbuhan lainnya, berturut-turut dari yang terbesar setelah jati belanda adalah: mindi, jabon, dan surian. Fraksi flavonoid pulai memiliki aktivitas yang relatif paling rendah di antara semua fraksi yang diuji. Oleh karena itu, fraksi flavonoid pulai tidak diuji lebih lanjut untuk penentuan efektivitasnya.

Sebaliknya, pengujian terhadap fraksi alkaloid hanya dilakukan terhadap tumbuhan pulai karena hanya pulai yang mengandung alkaloid pada analisis kandungan fitokimia secara kualitatif. Pengujian fraksi alkaloid larut air (polar) pulai pada konsentrasi yang sama (20

ppm) menunjukkan aktivitas penghambatan sebesar ~50%, besarnya penghambatan ini relatif lebih rendah dari yang ditunjukkan oleh ekstrak flavonoid pulai. Pengamatan terhadap aktivitas alkaloid pulai dalam percobaan ini konsisten dengan laporan terdahulu (Usman 2000) yang menerangkan bahwa efek hipokolesterolemia akibat pemberian ekstrak alkaloid pulai pada hewan coba tikus tidak terkait dengan aktivitasnya sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase

Gambar 3 memperlihatkan bahwa pengujian pada beberapa konsentrasi yang lebih rendah menunjukkan bahwa fraksi flavonoid jati belanda konsisten menunjukkan aktivitas penghambatan yang lebih besar daripada respon fraksi dari tumbuhan yang lain. Hal ini konsisten dengan penelitian terdahulu yang telah melaporkan efek hipokolesterolemia dari ekstrak kasar daun jati belanda (Sulistiyani *et al.* 2003).



Gambar 3 Aktivitas enzim HMG-KoA reduktase pada penambahan fraksi uji dengan beberapa konsentrasi.

Fakta bahwa kandungan kuersetin dalam ekstrak flavonoid jati belanda relatif paling sedikit dibandingkan dengan tumbuhan lainnya yang diuji, menunjukkan adanya kemungkinan senyawa flavonoid lain atau interaksi sesamanya yang menyebabkan aktivitas inhibisi tersebut. Chen *et al.* (2001) melaporkan hasil penelitiannya terhadap aktivitas inhibitor HMG-KoA dari 40 macam senyawa flavonoid dalam daun teh menggunakan sistem biakan sel Vero dan mendapati bahwa hanya satu macam saja yang signifikan menghambat kerja enzim.

Penetapan indeks penghambatan (IC_{50}) untuk menguji efektivitas tiap fraksi yang diuji dilakukan dengan menganalisis diagram pencar atas nilai penghambatannya dengan kisaran konsentrasi : 5-40 ppm. Analisis regresi terhadap data menghasilkan regresi nonlinear untuk semua ekstrak flavonoid yang diuji dengan kurva regresi

polinomial ordo 2 (Tabel 5). Data menunjukkan bahwa dari empat ekstrak flavonoid yang diuji lanjut untuk efektivitasnya, ekstrak jati belanda memiliki IC_{50} yang paling kecil yaitu sebesar 7,93 ppm. Namun demikian, perbedaan nilai IC_{50} dengan yang lain tidak terlalu besar, sehingga semua ekstrak flavonoid masih memiliki potensi yang sama besarnya untuk diuji lebih lanjut. Ada pun pengujian terhadap ekstrak alkaloid pulai fraksi polar menghasilkan kurva regresi dengan persamaan: $y = -0,0498x^2 + 3,4003x + 4,3894$, $R^2 = 0,9303$ dengan nilai IC_{50} sebesar 18,34 dan 49,94 ppm. Produk herbal/senyawa alami lain yang telah dilaporkan memiliki aktivitas sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase antara lain adalah ekstrak air daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dengan $IC_{50} = 2,959 \mu g ml^{-1}$ (ppm), ekstrak etanol dari akar *Anthocephalus indicus* dengan $IC_{50} = 5,310$ ppm (Patel *et al.* 2011).

Tabel 5 Indeks penghambatan 50% (IC₅₀) fraksi flavonoid tumbuhan hutan

Sampel	Persamaan garis	IC ₅₀ , ppm
Jati Belanda	$y = -0,1344x^2 + 5,9866x + 8,8382$ $R^2 = 0,9054$	7,93
Jabon	$y = -0,1732x^2 + 8,0102x - 10,83$ $R^2 = 0,9076$	9,58
Surian	$y = -0,1398x^2 + 6,728x - 1,9726$ $R^2 = 0,89$	9,67
Mindi	$y = -0,1001x^2 + 6,3174x - 5,2353$ $R^2 = 0,9685$	10,48

Kesimpulan

Eksplorasi terhadap lima jenis tumbuhan hutan, yaitu: pulai, jati belanda, jabon, mindi, dan surian menghasilkan simplisia dengan parameter baku mutu yang memenuhi persyaratan sesuai standar mutu yang ditetapkan. Berdasarkan hasil analisis kandungan fitokimia maka metabolit sekunder yang dominan pada simplisia daun kelima jenis tumbuhan adalah flavonoid, sedangkan alkaloid hanya terdeteksi dalam simplisia daun pulai.

Hasil asai enzimatis menunjukkan bahwa semua fraksi flavonoid yang diuji berpotensi menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase secara in vitro. Analisis efektivitas fraksi melalui penentuan konsentrasi penghambatan 50% (IC₅₀) terhadap HMGKoA reduktase secara konsisten menunjukkan bahwa fraksi flavonoid jati belanda memiliki potensi terbaik dengan IC₅₀ terkecil (7,93 ppm), namun demikian fraksi flavonoid jabon dan surian juga memiliki IC₅₀ relatif kecil (<10 ppm) sehingga layak/berpotensi diuji lebih lanjut terkait dengan pengembangan herbal antikolesterol. Sedangkan fraksi flavonoid dan alkaloid daun pulai memiliki potensi antikolesterol dengan mekanisme inhibitor HMGkoA reduktase yang lebih lemah atau mekanisme lain.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Dirjen Dikti Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan melalui Biaya Operasional Perguruan Tinggi Negeri (BOPTN) dalam Program PUPT/Penelitian Desentralisasi. Kelancaran administrasi dan teknis laboratorium sepenuhnya berkat bantuan Anggia Murni S.Si. dan Shelly Rahmania S.Si.

Daftar Pustaka

- Chang HL, Hung WC, Huang MS, Hsu HK. 2002. Extract from the leaves of *Toona sinensis* Roemor exerts potent antiproliferative effect on human lung cancer cells. *Am J Chin Med.* 30(2-3):307-314.
- Chen TH, Liu JC, Chang JJ, Tsai MF, Hsieh MH, Chan P. 2001. The in vitro inhibitory effect of flavonoid astilbin on 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase on Vero cells. *Chinese Med J.* 64(7):382-387.
- Chia YC, Wang PH, Huang YJ, Hsu HK. 2007. Cytotoxic activity of *Toona sinensis* on human lung cancers. *Nat Sc Co Rep.* 230.
- [Depkes] Departemen Kesehatan. 1989. *Materia Medika Indonesia Jilid*

- V. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan.
- [Depkes] Departemen Kesehatan. 2000. *Acuan Sediaan Herbal. Edisi I*. Jakarta: Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan.
- Do GM, Kwon EY, Ha TY, Park YB, Kim HJ, Jeon SM. 2011. Tannic acid is more effective than clofibrate for the elevation of hepatic β -oxidation and the inhibition of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase and aortic lesion formation in apo E-deficient mice. *British J Nut*. 106,:1855–1863.
- Edmonds J, Staniforth M. 1998. *Toona sinensis* (Meliaceae). *Curtis's Bot Mag*. 15:186–193.
- Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425-430.
- Harborne AJ. 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. 3rd Edition. Netherland: Springer.
- [HHS] Helsinki Heart Study, 1987. Primary prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. *New England Journal of Medicine*. 317, 1237–1245.
- Holdgate GA, Ward WHJ, McTaggart F. 2003. Molecular mechanism for inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase by rosuvastatin. *Biochem Soc Trans*. 31:528-531.
- Hseu YC, Chang WH, Chen CS, Liao JW, Huang CJ, Lu FJ, Chia YC, Hsu HK, Wu JJ, Yang HL. 2008. Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leaves extracts using different antioxidant models. *Food Chem Toxicol*. 46:105–114.
- Iqbal D, Khan MS, Khan A, Ahmad S, Srivastava AK, Bagga P. 2014. *In Vitro* screening for β -hydroxy- β -methyl glutaryl-coa reductase inhibitory and antioxidant activity of sequentially extracted fractions of *Ficus palmata* Forsk. *BioMed Res Internat*. 762620:1-10.
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan. 2009. *Keputusan Menteri Kesehatan RI No. 261/Menkes/SK/IV/2009 tentang Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- [Kemenkes] Kementerian Kesehatan. 2013. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. Jakarta: Kementerian Kesehatan.
- Kumar V, Khan MM, Khanna AK, Singh R, Singh S, Chander R, Mahdi F, MahdiAA, Saxena JK, Singh RK. 2008. Lipid lowering activity of *Anthocephalus indicus* root in hyperlipidemic rats. *eCAM*. 7(3):317-322.
- Lee SS, Moon SH, Lee HJ, Choi DH, Cho MH. 2004. Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis* var. platyphyllum. *J Korean Wood Sci Technol*. 32(1):17-27.
- [LRCP] Lipid Research Clinics Program. 1984. The lipid research clinics coronary primary prevention trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *J American Med Association*. 251:365–374.

- Markham KR. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Marinetti GV. 1990. *Disorder of Lipid Metabolism*. New York: Plenum Press.
- Mutiaticum D, Alegantina S, Astuti Y. 2010. Standardisasi simplisia dari buah miana (*Plectanthus seutelloroiders*) yang berasal dari 3 tempat tumbuh Menado, Kupang, dan Papua. *Bul. Penelit. Kesehat.* 38(1):1-16.
- Orhan IE, Guner E, Ozturk N, Senol FS, Erdem SA, Kartal M, Sener B. 2011. Enzyme inhibitory and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. naturalized in Anatolia and its phenolic acid and fatty acid composition. *Industrial Crops Prod J* 37: 213–218.
- Patel HD, Shah GB, Trivedi V. 2011. Investigation of HMG CoA reductase inhibitory activity of antihyperlipidemic herbal drugs in vitro study. *Asia J Exp Biol Sci.* 2(1):63-68.
- Pettret M, Costanzo P, Perrone-Filardi P, Chiariello M. 2010. Impact of gender in primary prevention of coronary heart disease with statin therapy: a meta-analysis. *Int J Cardiol.* 138(1):25-31.
- Pissutthanan S, Plianbangchang P, Pissutthanan N, Ruanruay S, Muanrit O. 2004. Brine shrimp lethality activity of thai medicinal plants in the family Meliaceae. *Naresuan Univ J* 12(2):13-18.
- Raasch RH. 1991. Pravastatin sodium, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *DICP Ann. Pharmacother.* 25:388-394.
- Raju J, Bird RP. 2007. Corrigendum to Diosgenin, a naturally occurring steroid saponin suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase expression and induces apoptosis in HCT-116 human colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 256(2):194-204.
- Rosenson RS. 2004. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 173:1-12.
- Sari RK, Syafii WS, Achmadi SS, Hanafi M. 2011. Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak etanol surian (*Toona sinensis*). *JITHH* 4(2):45-51.
- Sari RK, Armilasari D, Nawawi DS, Darmawan W, Mariya S. 2014. Aktivitas antiproliferasi ekstrak jabon putih (*Anthocephalus cadamba* Miq.) terhadap sel kanker payudara dan serviks. *J Ilmi Teknol Kayu Tropis* 12(1):91-100.
- Sulistiyani, Kristiani EBE, Darusman LK. 2003. Khasiat hipolipidemia ekstrak heksana dan ekstrak khloroform daun jati belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk.) *Prosiding Seminar Nasional Himpunan Kimia Indonesia (HKI)*; 2003 Juli 21-23; Malang. Jakarta: HKI.
- Sung JH, Lee SJ, Park KH, Moon TW. 2004. Isoflavones Inhibit 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68(2):428–432.
- Supriadi. 2001. *Tumbuhan Obat Indonesia. Penggunaan dan Khasiatnya*. Jakarta: Pustaka Populer Obor.

- Syafii W, Sari RK, Maemunah S. 2014. Uji bioaktivitas zat ekstraktif pohon mindi (*Melia azedarach* Linn) dengan metode *brine shrimp lethality test*. *J Ilmu Teknol Kayu Tropis* 12(1):48-55.
- Usman AP. 2000. Potensi antihiperkolesterolemia kulit batang kayu gabus (*Alstonia scholaris* R.Br.). [Disertasi] Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Wang KJ, Yang CR, Zhang YJ. 2007. Phenolic antioxidants from Chinese toon (fresh young leaves and shoots of *Toona sinensis*). *Food Chem* 10:365–371.
- WHO [World Health Organization]. 1998. *Quality Control Methods for Herbal Materials*. Geneva: WHO.
- WHO [World Health Organization]. 2016. *Global Hearts Initiative*. Geneva: WHO
- Yamauchi T, Abe F, Padolina WG, Dayrit FM. 1990. Alkaloids from leaves and bark of *Alstonia scholaris* in the Philippines. *Phytochemistry* 29:3321-3325.
- Riwayat naskah:
Naskah masuk (*received*): 25 Januari 2017
Diterima (*accepted*): 1 April 2017