

HYPERCHOLESTEREMIA



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2005

**POTENSI EKSTRAK MENGKUDU (MORINDA CITRIFOLIA)
TERHADAP SEKRESI NITRIC OXIDE (NO) DARI ENDOTEL
PEMBULUH DARAH HYPERKOLESTEROLEMIA**

Oleh:

**Drh. Lilik Maslachah, M.Kes.
Drh. Rahmi Sugihartuti, M.Kes.
Drh. Moh. Sukmanadi, M.Kes.**

KKC
KK
LP 18/08
Mas
P.

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Nasional,
Sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian
dan Pengabdian kepada Masyarakat
Nomor : 036/SPPP/PP-PM/DP3M/IV/2005
Nomor Urut : 38

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

November, 2005



IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA

JUDUL Bidang Ilmu Kategori Penelitian Peneliti Utama Nama (lengkap dengan gelar akademik) Jenis Kelamin Pangkat / Golongan NIP Jabatan Fakultas / Jurusan / Puslit. Perguruan Tinggi Alamat Kantor : Telp./Fax dan e-mail Alamat Rumah dan Telp. /Fax Jangka Waktu Penelitian Biaya yang diusulkan	: Potensi Ekstrak Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>) Terhadap Sekresi Nitric Oxide (NO) dari Endotel Pembuluh Darah Hiperkolesterolemia : Kesehatan : Kesehatan : Lilik maslachah, M.Kes., drh : Perempuan : Lektor / IIIc : 132 061 818 : Penata Muda Tk I : Fakultas Kedokteran Hewan : Universitas Airlangga : Fakultas Kedokteran Hewan Unair : Arif Rahman Hakim 106 Keputih Surabaya Tlp. (031) 5995019 : 6 Bulan : Rp. 6.000.000
--	---

Mengetahui
Dekan / Pusat Penelitian,

Prof. Dr. Ismudiono, drh.
NIP. 130 687 297

Surabaya, 22 Oktober 2005
Ketua Peneliti,

Lilik Maslachah, M.Kes., drh.
NIP. 132 061 818

Mengetahui
Ketua Lembaga Penelitian,

Prof. Dr. H. Sarmanu, MS.
NIP. 130 701 125



RINGKASAN

Judul Penelitian	: Potensi Ekstrak Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>) Terhadap Sekresi Nitric Oxide (NO) dari Endotel Pembuluh Darah Hiperkolesterolemia
Ketua Peneliti	: Lilik Maslachh, M.Kes., drh.
Anggota Peneliti	: Rahmi Sugihartuti, M.Kes.,drh. M. Sukmanadi, M.Kes.,drh.
Tahun Penulisan dan Jumlah	: 2005
Fakultas/ Jurusan	: Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas	: Airlangga
Sumber Biaya	: Dibiayai Oleh Bagian Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi
DIP Nomor	: 522144
Kontrak nomor	: 729/J03.2/PG/2005

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia*) mempunyai kemampuan melindungi dan memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia. Tujuan khusus untuk membuktikan bahwa ekstrak mengkudu dapat meningkatkan sekresi NO (kadar nitrit dan nitrat) dari endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan dengan memakai rancangan acak lengkap. Dalam penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus jantan umur 3 bulan, sehat dengan berat tubuh 200 gram sebanyak 21 ekor.

Prosedur penelitian meliputi tahap persiapan, hewan coba diadaptasikan dengan kondisi lingkungan, pakan dan minum adlibitum selama 1 minggu. Tahap perlakuan seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam 3 kelompok. Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Ekstrak mengkudu diberikan secara oral dengan menggunakan sonde lambung sehari sekali pada pagi hari sebelum pemberian pakan selama 2 bulan . Perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut : Po1 : Kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang diberi pakan standar dan aquades 5 ml. Po2 : kontrol positif yaitu kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan aquades 5 ml. P1 : Kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan ekstrak mengkudu 60 % 5 ml.

Pengambilan sampel darah pada hari terakhir, sebelum pengambilan darah hewan coba dipuaskan terlebih dahulu dipuaskan selama 12 jam tetapi air minum tetap diberikan,

kemudian dianestesi dengan ether selanjutnya darah diambil dengan cara intra cardial sebanyak 5 ml untuk pemeriksaan NO dengan mengukur kadar Nitrit dan Nitrat yang merupakan marker untuk aktivitas nitric oxide sintetase dengan menggunakan reagen Griess. Data hasil pengukuran kadar nitric oxide (nitrit dan nitrat) yang diperoleh dianalisa dengan dengan uji analisis varian (ANOVA). Bila terdapat perbedaan bermakna di antara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji LSD

Hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan 21 ekor tikus jantan yang terbagi dalam tiga kelompok perlakuan, didapatkan hasil *optical density* dari pemeriksaan kadar nitrit dan nitrat sebagai berikut: *Optical density* kadar nitrit dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5 % didapatkan hasil bahwa perlakuan P0 (kontrol) memiliki kadar nitrit yang tertinggi yang berbeda nyata dengan kelompok P1 (pakan tinggi lemak) dan P2 (pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) $p < 0,05$ sedangkan pada kelompok P1 (Pakan tinggi lemak) tidak berbeda nyata dengan kelompok P2 (pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) $p > 0,05$, sedangkan data hasil *optical density* kadar nitrat dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (P0, P1, P2) $p > 0,05$. Tetapi dari data hasil penelitian *optical density* kadar total nitrit dan nitrat dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5 % didapatkan bahwa perlakuan P2 (Pakan tinggi kolesterol + ekstrak mengkudu 60 %) dan P0 (Kontrol) memiliki kadar nitrit yang tertinggi yang berbeda nyata dengan kelompok P1 (Pakan tinggi kolesterol) $p < 0,05$ P0 sedangkan P2 (Pakan tinggi kolesterol + ekstrak mengkudu 60 %) dengan kelompok P0 (kontrol) tidak berbeda nyata $p > 0,05$. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :Ekstrak mengkudu 60 % berpengaruh terhadap kadar peningkatan sekresi NO (nitrit dan nitrat) pembuluh darah hiperkolesterolemia.

Summary

Potency Extract of Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) to Secretion of Nitric Oxide (NO) from Endothelial Cell hypercholesterolemia.

Lilik Maslachah, R. Sugihartuti, M. Sukmanadi

The study was generally aimed to prove that Potency Extract of Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) to Secretion of Nitric Oxide (NO) from endothelial cell hypercholesterolemia. The study was an laboratory experiment using Completed Randomized Design. In the study, the sample were 21 albino wistar rats, weighed 200 grams, and 3 months age.

Experimental procedure: Preparation step. All samples were conditioned to the environment and feed for 7 days. Treatment step. All samples were divided into 3 groups, each group consist of 7 rats.. Details of treatment to each group were as follows :

Control groups concisted of Po : 7 rats that were given fed a standard diet and aquadest 5 ml for 2 month. P1 : 7 rats that were given fed a hight cholesterol diet and aquadest 5 ml for 2 month P2 : 7 rats that were given fed a hight cholesterol diet and 60 % extract of Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) 5 ml for 2 month. On the last day of treatment, all rats of any groups were anaesthetised using ether and then killed, their blood were taken 5 ml. Serum from blood were processed to measure the Nitrit and Nitrat level using Griess reagent.

The data was analysed using analysis of variance (ANOVA). If differences were found, the analysis was then continued by using LSD.

From the experiment, it had been concluded that 60 % extract of Mengkudu (*Morinda Citrifolia*) could increased secretion Nitric Oxide (NO) (Nitrite and Nitrate) from endothelial cell hypercholesterolemia

KATA PENGANTAR

Puji syukur yang tak terhingga penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan KaruniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan laporan penelitian dengan tepat waktu. Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan penghargaan dan ucapan terimakasih yang setulus –tulusnya kepada :

1. Bapak Rektor Universitas Airlangga melalui Kepala lembaga Penelitian Universitas Airlangga yang telah mengijinkan dan membiayai penelitian ini melalui sumber dana Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya Manusia, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan Tinggi.
2. Bapak Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga yang telah mengijinkan penulis untuk melaksanakan penelitian
3. Bapak Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah mengijinkan penulis untuk melaksanakan optimasi penelitian di Bagian Kimia Farmasi.
4. Yang Terhormat Bapak Drs.H.Harjana,M.Sc yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis dan memberikan kemudahan kepada penulis dalam persiapan penelitian ini.
5. Kepala Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga yang telah mengijinkan pemanfaatan fasilitas kandang hewan coba
6. Semua pelaksana di TDC yang telah membantu pembacaan hasil penelitian ini
7. Semua pihak yang telah membantu baik langsung maupun tidak langsung dalam kelancaran penelitian ini.

Akhirnya dengan tulus penulis sangat mengharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan penelitian ini. Semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat bagi semua, khususnya perkembangan ilmu pengetahuan

Surabaya, 26 Oktober 2005

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN	i
RINGKASAN / SUMMARY	iii
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Hipotesis	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Mengkudu	4
2.2. Kandungan Kimia dan Manfaat	4
2.3. Kolesterol.....	5
2.4. Sintesis Kolesterol.....	6
2.5. Fungsi Endotel.....	6
2.6. Peran Endotel pada Hiperkolesterolemia dan Aterosklerosis.....	10
2.7. Biosintesis NO.....	11
2.8. Daur Non Enzimatis NO	13
2.9. Mekanisme Pelepasan Nitric Oxide dari Endotel Pembuluh Darah.....	13
2.10. Mekanisme Kerja NO pada Otot Polos Pembuluh Darah.....	14

III TUJUAN DAN MANFAAT.....	15
3.1. Tujuan Umum.....	15
3.2. Tujuan Khusus.....	15
3.3. Manfaat Penelitian.....	15
IV METODE PENELITIAN	16
4.1. Tempat Penelitian.....	16
4.2. Sampel dan Besar Sampel.....	16
4.3. Variabel Penelitian.....	16
4.4. Definisi Operasional Variabel.....	17
4.5. Bahan dan Instrumen Penelitian.....	17
4.5.1. Hewan Percobaan	17
4.5.2. Bahan Pakan dan Minum.....	17
4.5.3. Bahan Kimia.....	18
4.5.4. Instrumen.....	18
4.6. Prosedur Penelitian.....	18
4.6.1. Tahap Persiapan.....	18
4.6.2. Pembuatan Ekstrak cair Mengkudu.....	19
4.6.3. Tahap Perlakuan.....	19
4.6.4. Pengambilan Sampel Darah.....	20
4.7. Pemeriksaan NO.....	20
4.8. Analisis Data.....	21
V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22

VI.KESIMPULAN DAN SARAN..... 31

DAFTAR PUSTAKA..... 32

LAMPIRAN..... 36

DAFTAR TABEL

Tabel No.	Halaman
1. Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Kadar Nitrit.....	22
2. Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Kadar Nitrat.....	26
3. Nilai <i>Optical Density</i> (OD) Kadar Total Nitrit dan Nitrat.....	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran No	Halaman
1. Penghitungan Dosis Ekstrak Cair Mengkudu.....	36
2. Analisis Hasil <i>Optical Density</i> Kadar Nitrit.....	37
3. Analisis Hasil <i>Optical Density</i> Kadar Nitrat.....	38
4. Analisis Hasil <i>Optical Density</i> Kadar Nitrit dan Nitrat	39

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit jantung koroner merupakan penyebab kematian utama dinegara maju. Hasil survei kesehatan rumah tangga tahun 1992 melaporkan penyakit sistim sirkulasi sudah merupakan penyebab kematian yang semakin banyak di Indonesia. Dalam upaya menurunkan morbiditas dan mortalitas penyakit jantung koroner, pengendalian faktor risiko merupakan prioritas utama, baik pada pencegahan primer maupun skunder, oleh karena itu diperlukan pemahaman yang baik mengenai faktor risiko serta mekanisme yang berperan pada penyakit jantung koroner (Alwi I, 1996)

Hiperkolesterolemia sangat berperan terhadap gangguan kardiovaskuler terutama terjadinya atherosklerosis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa gangguan kardiovaskuler pada manusia dan keparahan atherosklerosis pada hewan coba berhubungan dengan tingginya kadar kolesterol dalam darah.(Miller,1990; Cordan, 1997).

Menurut Balagopalakrishna (1997), pada keadaan hiperkolesterolemia dapat menyebabkan kerusakan sel endotel. Adanya kerusakan sel endotel ini diakibatkan oleh adanya peningkatan pembentukan radikal superoksida yang kemudian dapat menyebabkan oksidasi LDL. LDL yang teroksidasi dapat menginaktivasi Nitric oxide (NO).

Adanya kerusakan endotel menyebabkan kegagalan endotel untuk melepaskan NO sebagai mediator vasodilatasi, yang disebabkan karena penurunan pembentukan NO, peningkatan degradasi dan penurunan sensitivitas pada pembentukan NO oleh endotel (Sozmen B,1998)



Endotel mempunyai peran yang sangat penting dalam menjaga integritas pembuluh darah. Pada keadaan normal mediator yang dilepaskan adalah NO dan Prostasiklin. NO tidak hanya bekerja untuk dilatasi otot polos pembuluh darah tetapi juga berperan menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, merangsang disagregasi platelet dan menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. Selain itu juga NO bekerja sebagai agen antiinflamasi dengan menghambat adhesi dari monosit dan neutrofil pada permukaan endotel dan bekerja sebagai antioksidan. Adanya adhesi platelet, monosit, neutrofil pada permukaan endotel merupakan suatu proses awal atherosklerosis (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

Endotel merupakan target organ salah satu penyakit hipertensi. Hal ini terjadi karena adanya atherosklerosis pada pembuluh darah. Untuk mencegah proses atherogenesis ini dapat dilakukan dengan cara penurunan kadar kolesterol darah (Meredith, *et al.*, 1993)

Salah satu tanaman obat yang sering digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional untuk menurunkan tekanan darah tinggi dan hiperkolesterolemia adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia*). Mengkudu (*Morinda citrifolia*) mengandung bahan berkhasiat yang berperan dalam mengatasi keadaan hiperkolesterolemia yaitu proxeronin-xeronin, pektin beserta kandungan zat kimia lainnya yang mempunyai potensi sebagai antioksidan seperti: Scopoletin, beta karoten, asam ascorbat dan selenium (Sjabana dan Ramadhani, 2002). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Sally dan Zaini (2003) menunjukkan bahwa Mengkudu pada dosis 60 % dapat menurunkan kadar kolesterol darah, LDL, Triglesirida dan peningkatan kadar HDL serta dapat memperbaiki struktur histologi pembuluh darah (penebalan intima) pembuluh darah mencit yang diberi

diet tinggi lemak, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ekstrak mengkudu dosis 60% yang merupakan dosis efektif terhadap perlindungan dan fungsi endotel melalui pengukuran kadar NO pada pembuluh darah hiperkolesterolemia.

1.2. Rumusan Masalah

Dari latar belakang permasalahan yang diuraikan sebelumnya, permasalahan dalam penelitian ini dirumuskan sebagai berikut :

Apakah pemberian ekstrak mengkudu dapat meningkatkan sekresi NO (Nitrit dan Nitrat) dari endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia ?

1.3. Hipotesis

Sehubungan dengan permasalahan di atas dan tinjauan teori diajukan hipotesis sebagai berikut :

Ekstrak mengkudu dapat meningkatkan sekresi NO (Nitrit dan Nitrat) dari endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mengkudu

Mengkudu merupakan tanaman perdu atau pohon kecil yang tumbuh membengkok, tinggi 3-8 meter, berbatang licin. Daun tanaman ini tunggal, bersilang berhadapan, bertangkai, berbentuk bulat telur lebar sampai elips dengan ujung meruncing dan bertepi rata. Panjang daun 10 – 40 cm dan lebar 5-17 cm. Bunga berwarna putih dan berbau harum, merupakan bunga majemuk yang tersusun dalam karangan bunga berbentuk bonggol dan terdapat pada ketiak daun. Buahnya buni majemuk, bertangkai 3-5 cm, berbentuk bulat lonjong atau segitiga memanjang dengan panjang 5 – 10 cm. Permukaan buah tidak rata dan terdapat kutil-kutil. Buah yang masih muda berwarna hijau dan yang sudah masak berwarna kuning keruh. Daging lunak dan bercelah serta berbau busuk (Wijayakusuma, 2002).

2.2. Kandungan Kimia dan Manfaat Mengkudu

Zat yang terkandung dalam mengkudu antara lain antrakinin, glikosida, alizarin, rubiadin, darmacantal, triterpenioid, zeronin, scopoletin, asam ascorbat, beta carotene. Bahan berkhasiat yang berperan dalam mengatasi keadaan hiperkolesterolemia ini adalah proxeronin-xeronin, pektin beserta kandungan zat kimia yang mempunyai potensi sebagai antioksidan seperti : Scopoletin, beta karoten, asam ascorbat dan selenium (Sjabana dan Ramadhani, 2002)

Buah mengkudu memiliki khasiat yang belum jelas secara medis, namun secara empiris telah banyak orang yang mengalami perbaikan dan peningkatan kesehatan setelah

mengonsumsi sari buahnya. Beberapa masalah kesehatan yang dapat diatasi dengan mengkudu diantaranya adalah gangguan system kardiovaskuler seperti kolesterol tinggi dan penebalan otot jantung, hipertensi (Waha, 2001). Menurut Solomon (2000) peneliti dari Amerika melaporkan bahwa buah mengkudu mengandung sejenis fitonutrien yaitu scopoletin yang berfungsi memperlebar saluran pembuluh darah yang mengalami peyempitan. Menurut Syahbana dan Ramadhani (2002) buah mengkudu mengandung efek vasoproteksi yaitu efek-efek perlindungan terhadap kualitas pembuluh darah.

Menurut Archibaldan (1994), buah mengkudu mengandung asam ascorbat yaitu suatu sumber vitamin C yang berguna untuk epitelisasi normal pembentuk pembuluh darah.

Buah mengkudu mengandung L arginin yaitu suatu asam amino non esensial yang dapat meningkatkan nitric oxide (NO) sehingga dapat menurunkan percepatan terjadinya aterosklerosis (Meredith *et al*, 1993 ; Sjabana dan Ramadhani, 2002)

2.3. Kolesterol

Molekul steroid yang mengandung fungsi hidroksil tetapi tidak gugus karboksil atau aldehida dinamakan sterol. Salah satu contoh sterol adalah kolesterol. Kolesterol hanya terdapat dalam sel hewan dan manusia kolesterol menyebabkan kekakuan pada membran sel sehingga semakin banyak kolesterol akan menyebabkan semakin kaku membrane sel (Wilbraham *et al*, 1992)

2.4.Sintesis kolesterol

Sumber kolesterol ada dua yaitu kolesterol dari makanan dan kolesterol yang disintesis usus. Untuk kolesterol yang disintesis dalam usus jumlahnya dikendalikan oleh banyaknya kolesterol yang berasal dari makanan dan pemasukan asam lemak. Prekursor sintesis kolesterol adalah asetil KoA yang dapat dibentuk dari glukosa, asam lemak atau asam amino. Dua molekul asetil koA membentuk asetil KoA yang bergabung dengan asetil koA lainnya membentuk Hidroksi Metilglutaril KoA (HMG KoA). Reduksi HMG KoA menghasilkan mevalonat yang merupakan senyawa khas dalam sintesis kolesterol. Reaksi yang dikatalisis oleh HMG KoA reduktase ini adalah reaksi penentu kecepatan pembentukan kolesterol. Mevalonat menghasilkan unit-unit isoprene yang akhirnya saling bergabung membentuk skualen. Siklisisasi skualen menghasilkan system cincin steroid dan sejumlah reaksi selanjutnya menghasilkan kolesterol. Sintesis kolesterol dalam tubuh terutama terdapat pada hati, usus, kortek adrenal, jaringan reproduksi termasuk ovarium, testes dan plasenta. Kontrol utama sintesis kolesterol terletak pada isoenzim di sitoplasma HMG KoA reduktase yang mengkatalisis reaksi yang menghasilkan asam mevalonat. Pembentukan asam mevalonat dari HMG KoA adalah reaksi enzimatik yang dipengaruhi oleh kontrol makanan. Sifat kolesterol yang tidak larut dalam air maka zat ini diangkut dalam darah sebagai lipoprotein. Ada lima macam lipoprotein yaitu kilomikron, VLDL, IDL, LDL dan HDL (Marks *et al*, 2000) .

2.5. Fungi Endotel Pada Sistem Bilologis

Sel endotel mempunyai peranan sangat penting dalam menjaga fungsi fisiologis normal dari dinding pembuluh darah, jika sel ini menjadi disfungsi maka akan terjadi

perubahan patofisiologi dalam pembuluh darah. Endotel sebagai sistem signal mempunyai peranan penting dalam mengatur fungsi pembuluh darah dan organ (Luscher and Tanner, 1993).

Dalam keadaan normal endotel memainkan peranan penting dalam melindungi dan menjaga fungsi fisiologis dari dinding pembuluh darah, menghambat kontraksi dan juga migrasi dan pertumbuhan dari sel otot polos pembuluh darah, aktif menghambat proses koagulasi dan merangsang pelarutan gumpalan yang telah dibentuk di dalam lumen (Fibrinolisis). Endotel juga mempunyai peran penting sebagai anti inflamasi dan mengatur adhesi dan migrasi sel inflamasi ke dalam dan menembus dinding pembuluh darah juga aktif dalam mengatur fungsi organ (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

Sel endotel dapat melepaskan bermacam-macam mediator vasoaktif yang dikativasi oleh perbedaan rangsangan. Pada kondisi normal mediator vasodilator yang dilepaskan adalah "*Endothelium Derived Relaxing Factor*" (EDRF, NO, atau NO Donor) dan prostasiklin. Prostrasiklin menyebabkan relaksasi dari otot polos pembuluh darah dengan merangsang adenyl cyclase dan meningkatkan kadar siklik AMP otot polos. NO merangsang guanylate cyclase dan meningkatkan kadar siklik GMP. Endotel juga melepaskan substansi yang dapat meningkatkan hiperpolarisasi dari otot polos pembuluh darah dan relaksasi, efek ini mungkin diperantarai oleh siklik GMP atau efek langsung dari NO pada Ca channel. Efek NO untuk menyebabkan hiperpolarisasi tergantung juga pada adanya atau tidak adanya regangan pada pembuluh darah. Regangan ini langsung memodulasi aktivitas otot polos Ca channel atau sensitivitasnya pada NO (Flavahan, 1992; Busse, *et al.*, 1993; Flavahan and Vanhoutte, 1995).

Mediator "*endothelium derived vasodilator*" mempunyai efek penting yang lain pada dinding pembuluh darah yang memberi kontribusi untuk berperan menjaga endotel. Agen ini bekerja tidak hanya untuk dilatasi pembuluh darah, ia juga dapat menghambat proliferasi otot polos, agregasi platelet, menghambat adhesi platelet pada permukaan endotel. NO juga bekerja sebagai antiinflamasi dengan menghambat adhesi monosit dan neutrofil pada permukaan endotel, dan bekerja sebagai antioksidan. NO dapat mencegah oksidasi LDL sebagai mediator atherogenik. Kemampuan kerja NO untuk menghambat peningkatan pertumbuhan lesi atherosklerosis ditunjukkan dengan kemampuan dari L-arginine sebagai prekursor NO untuk menghambat pertumbuhan lesi (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

"*Endothelium derived dilator*" yang lain yang juga memberi kontribusi untuk berperan menjaga endotel adalah prostasiklin, seperti juga NO ia juga dapat menghambat pertumbuhan otot polos dan aktivasi platelet. Endotel juga melepaskan mediator kontraktile yang disebut "*Endothelium Derived Contractile Factor*" (EDCFs) yang disebut juga endotelin. Endotelin ini menyebabkan kontraksi dengan mengaktivasi reseptor spesifik pada otot polos. EDCFs juga dapat dihasilkan dari metabolisme siklooksigenase dari asam arakhidonik, tromboxone dan prostaglandin H₂ yang mengaktivasi reseptor yang sama dan superoksida yang dapat menyebabkan kontraksi secara langsung atau tidak langsung dengan inaktivasi NO (Vanhoutte, 1993).

Pada kondisi fisiologis normal sel endotel melepaskan mediator vasodilatasi (NO, EDHF, Prostrasiklin) dengan mediator utama pada arteri koronair besar adalah "*Endothelium Derived Relaxing dan Contracting Factor*" dapat mengaktivasi endotel untuk melepaskan NO. Nitric oxide juga dapat menghambat produksi dan pelepasan

endotelin dari sel endotel (Busse *et al*, 1993; Luscher and Tanner, 1993; Flavahan and Vanhoutte, 1995). Nitric oxide dihasilkan oleh endotel disintesis dari L-arginin dengan bantuan enzim NO sintase (NOS). Enzim NO sintase membentuk NO dan sitrulin dari oksidasi guanidin dari asam amino L-arginine. Enzim NO sintase terikat kalmodulin dan diaktivasi rangsangan peningkatan konsentrasi dari kalsium intraseluler bebas. Prostaglandin adalah metabolit asam arakhidonik yang disintesa oleh prostaglandin sintase yaitu suatu kofaktor yang tidak spesifik yang tidak tergantung pada kalsium intraseluler, akan tetapi asam arakhidonik dihasilkan dari aktivasi kalsium dependent dari fosfolipase A₂, sedangkan identifikasi EDHF dan mekanisme pengontrolan dan pelepasannya belum diketahui yang mungkin berasal dari metabolit sitokrom P450 dari asam arakhidonik yang juga ditentukan oleh perubahan kadar kalsium intraseluler (Busse *et al.*, 1993; Luscher and Tanner, 1993; Flavahan and Vanhoutte 1995).

Jadi rangsangan dari pelepasan mediator "*endothelium derived dilator*", EDRF, prostaglandin, EDHF menjadi meningkat tergantung konsentrasi kalsium bebas dalam intraseluler. Permukaan sel endotel mempunyai bermacam-macam reseptor terikat membran dan dapat diaktivasi oleh sirkulasi hormon (epineprin, vasopresin, angiotensin, insulin), autakoid yang dibentuk dalam dinding pembuluh darah (bradikinin, histamin, serotonin), pelepasan neurotransmitter dari saraf otonomik (norepinephrine, asetilkholin) atau saraf sensorik (substansi P, kalsitonin) atau pelepasan mediator dari sel sirkulasi (serotonin, ADP) atau dari endotel (endotelin, ATP / ADP, bradikinin). Sel endotel juga mempunyai bermacam-macam proses signal transduksi yang dapat menterjemahkan signal yang dihasilkan oleh pendudukan agonist pada permukaan reseptor untuk meningkatkan konsentrasi ion kalsium intraseluler (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

Secara prinsip penggunaan membran endotel terikat reseptor seperti protein G tergantung dari aktivasi fosfolipase C. Fosfolipase C dihidrolisis menjadi prekursor lipid fosfatidilinositol 4,5 bisfosfat untuk menghasilkan diasilgliserol (DAG) dan inositol tri fosfat (IP3), sesudah itu mengalami fosforilasi menjadi IP4. IP3 merangsang pelepasan kalsium dari simpanan intraseluler, sedangkan IP4 mengaktifkan permeabilitas kalsium channel pada sel membran yang menimbulkan influk kalsium intrasel. Pembentukan IP3 dan IP4 meningkatkan kadar kalsium dalam sel endotel menyebabkan aktivasi sel dan pelepasan mediator relaksasi (Busse *et al.*, 1993).

Endotel juga dapat diaktivasi oleh perubahan lingkungan fisik, kimia dari sel. Sel endotel sensitif pada perubahan mekanik, shear stress dan pada perubahan tekanan. Membran plasma dari sel endotel mengandung channel kation mekanosensitif mengatur influk kalsium ketika sel teregang. Shear-stress sensitif K Channel dapat mengaktifkan pelepasan mediator. Aktivasi dari shear stress K channel akibat dari pengaruh shear stress pada membran sel atau sitoskeleton atau akibat dari pembentukan ADP atau bradikinin tergantung endotel atau aktivasi dari protein Gi-2 endotel (Flavahan and Vanhoutte, 1995).

2.6. Peran Endotel Pada Hiperkolesterolemia dan Atherosklerosis

Hiperkolesterolemia dan atherosklerosis berhubungan dengan pembentukan dan respon otot polos pembuluh darah pada NO dan stimulasi jalur siklooksigenase, faktor kontrakting, anion superoksid, angiotensin II dan endotelin. Pada atherosklerosis LDL khususnya LDL teroksidasi terjadi akumulasi, LDL teroksidasi ini akan menginduksi ekspresi preendothelin messenger RNA dan meningkatkan pelepasan endotelin. LDL teroksidasi juga secara langsung mengaktifkan produksi endotelin dengan mengaktifkan

fosfolipase C selanjutnya mengaktifkan protein kinase C untuk melepaskan endotelin. Peningkatan endotelin ini berperan sebagai vasokonstriktor pada pembuluh darah arteriosklerosis dan pada tempat tertentu akan berkembang menjadi plak atherosklerosis. Plak artherosklerosis ini mengandung sejumlah elemen seluler abnormal yang meliputi leukosit, makrofag, dan adhesi platelet, yang melepaskan vasoaktif, termasuk tromboksan A₂ dari platelet dan leukosit, leukotrine dari leukosit, oksigen derived radikal dari leukosit dan makrofag dan vasonkonstriktor prostanoid dari leukosit. LDL teroksidasi menurunkan endotel dependent relaksasi yang merupakan efek dari penurunan pembentukan NO. Pada atherosklerosis juga terjadi defisiensi signal membran dalam sel endotel, difisiensi arginin dan peningkatan degradasi EDRF oleh anion superoksid (Luscher and Boulanger, *et al.*, 1993; Luscher and Tanner, 1993; Drexler, 1996).

Ada beberapa langkah strategis yang dapat dilakukan untuk memperbaiki kerusakan endotel pada proses atherosklerosis antara lain dengan jalan : Terapi untuk menurunkan kholesterol, konsumsi makanan yang kaya minyak ikan, pemberian L-arginine sebagai prekursor NO dan mencegah degradasi NO melalui inaktivasi radikal bebas superoksid dengan superokside dismutase. Langkah ini penting dalam pencegahan penyakit arteria koronaria khususnya penyakit kardiovaskuler (Meredith *et al.*, 1993).

2.7. Biosintesis NO

Nitrogen Oksida (NO) dengan prekursor asam amino L-Arginin serta resiklingnya adalah L-sitrulin. Tahap awal dari biosintesa tersebut adalah hidroksilasi dari atom nitrogen yang ada dalam gugus guanidin dari asam amino L-arginin. Reaksi ini dikatalisis enzim NO sintase (NOS; EC 1.14.13.39) (Evans, 1995).

Dalam aktivitasnya enzim NOS didukung oleh 5 kofaktor yaitu NADPH, FAD, FMN, Heme dan tetrahidrobiopterin (BH₄) yang dianggap sebagai kosubstrat (Murray dkk, 2000).

NO dapat dibentuk dari senyawa nitrit (sebagai vasodilator dari gliseril trinitrat) pada metabolismenya. Waktu hidup senyawa NO (*life time*) sangat singkat 3 – 4 detik dan selanjutnya dapat bereaksi dengan oksigen atau superoksida untuk menghasilkan peroksinitrit (ONOO⁻) yang akan terkomposisi menghasilkan radikal – OH (Ungvari *et al.*, 2003).

Inhibisi pembentukan NO dapat menyebabkan vasokonstriksi dan meningkatnya tekanan darah, sehingga dapat dianggap bahwa senyawa NO merupakan pengontrol tekanan darah secara *in vivo*. Enzim NO sintase merupakan isoenzim dengan beberapa bentuk isoform yang telah teridentifikasi (Anggard, 1994). Diantaranya yang terpenting adalah NOS konstitutif (cNOS) yang terdapat dalam endothelium dan jaringan syaraf serta NOS induksi (iNOS) pada sel imun dan sel otot polos pembuluh darah.

Ketiga bentuk isoenzim NOS tersebut dikode oleh gen yang berbeda. NOS induksi (iNOS merupakan NOS tipe II), NOS neuronal (nNOS merupakan NOS tipe I) dan NOS endotel (eNOS merupakan NOS tipe III). Enzim nNOS dan eNOS merupakan ekspresi konstitutif pada level rendah dalam berbagai tipe sel. Sedangkan iNOS tidak terekspresi secara normal didalam berbagai sel, namun hanya terinduksi pada endotoksin bakteri dan sitokinin inflamasi (Wu dan Morris, 1998).

Aktivitas NOS konstitutif dikendalikan oleh ion kalsium dan kalmodulin. Dalam hal ini dapat dipahami bahwa kapasitas selular enzim NOS itu, sangat ditentukan oleh



tingkat ekspresi NOS serta faktor efisiensi katalitik seperti ion kalsium dan kalmodulin atau kofaktor esensial seperti tetrahidro bioperin (Murray dkk, 2000).

2.8. Daur Non Enzimatik NO

Disfungsi endotel akan sangat berhubungan dengan peningkatan stress oksidatif, melalui senyawa-senyawa oksigen reaktif (*Reactive oxygen species* = ROS) seperti peroksida yang meningkat. Jika NOS diinkubasi bersama dengan lipoprotein berdensitas rendah (*Low Density Lipoprotein* = LDL) maka sel endotel akan lebih dulu membentuk spesi diokigen dibandingkan dengan NO. Namun hal ini dapat diatasi dengan pemberian L-arginin. Konsentrasi arginin dan peroksida yang dibutuhkan dalam reaksi in vitro ini adalah sangat tinggi 10 mmol/L. selain itu dapat disebutkan bahwa sintesa NO non enzimatis dapat menggunakan substrat baik L maupun D-arginin. Sementara NOS hanya menggunakan substrat stereospesifik L-arginin (Chowienczyk and Ritter, 1997)

2.9. Mekanisme Pelepasan Nitric Oxide Dari Endotel Pembuluh Darah

Pada prinsipnya ada dua type pelepasan NO dari endotel pembuluh darah yaitu keadaan basal dan pelepasan yang distimulasi. Dalam keadaan basal NO dilepaskan secara terus menerus, sintesis NO pada endotel dapat ditingkatkan oleh "*reseptor dependent*" (asetilkholin, ATP, atau bradikinin) dan "*agonist independent*" (Ca^{++} ionofore, polokation atau Ca^{++} ATPase inhibitor). Rangsangan fisik seperti shear stress cairan, kelenturan dari dinding pembuluh darah atau tekanan O_2 arterial yang rendah dapat merangsang pelepasan NO diatas kadar basal. Shear stress menginduksi pelepasan NO menjadi faktor penting dalam pengaturan tonus vaskuler dan meningkatkan pengaliran

nutrisi darah pada organ aktif, sedangkan “*agonist independent*” memperantarai pelepasan NO dianggap sebagai cadangan sementara dan untuk memenuhi kebutuhan lokal jika konsentrasi NO tinggi misalnya dalam pembentukan mikrothrombi (Busse *et al.*, 1993).

2.10. Mekanisme Kerja NO Pada Otot Polos Pembuluh Darah

Pada tahun 1987 dipastikan bahwa EDRF identik dengan NO (*nitric oxide*). *Nitric Oxide* dilepaskan oleh sel endotel sebagai persenyawaan kimia yang tidak stabil dengan waktu paruh hanya beberapa detik. Nitric oxide bekerja pula pada tempat-tempat lain didalam tubuh organisme seperti aktivasi granulosit atau sebagai zat transmitter didalam otak. Nitric oxide yang dilepaskan oleh endotel menembus kedalam otot polos pembuluh darah dengan difusi, atau kedalam trombosit yang bersentuhan dengan endotel. Disana, ia merangsang enzim solubel guanilat siklase, sehingga menimbulkan peningkatan kadar GMP-siklis didalam serabut otot polos dan didalam trombosit. Baru-baru ini telah diperlihatkan hubungan langsung antara peningkatan kadar GMP siklis didalam sel dengan relaksasi otot atau inhibisi agregasi trombosit (Lukmanto, 1990)

BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan umum :

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia*) mempunyai kemampuan melindungi dan memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia

3.2. Tujuan khusus :

Untuk membuktikan bahwa ekstrak mengkudu dapat meningkatkan sekresi NO (nitrit dan nitrat) dari endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia.

3.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat secara ilmiah sebagai berikut :

Memberikan informasi bahwa pemberian ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia*) dapat melindungi dan memperbaiki fungsi endotel pembuluh darah hiperkolesterolemia

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran dan di TDC Universitas Airlangga Surabaya.

4.2. Sampel dan Besar Sampel

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan rancangan acak lengkap. Dalam penelitian ini digunakan binatang percobaan tikus Wistar jantan umur 3 bulan, sehat dengan berat tubuh 200 gram. Besar sampel untuk setiap perlakuan ditentukan dengan rumus dari Lameschow *et al* (1990) $(n-1)(r-1) > 15$

4.3. Variabel Penelitian

A. Variabel bebas

Dalam penelitian ini digunakan dua variabel bebas

- Pemberian pakan tinggi kolesterol
- Pemberian ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia*)

B. Variabel kendali

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel kendali yaitu :

- _ Tikus yang digunakan berjenis kelamin jantan
- _ Digunakan Tikus dengan berat badan yang seragam
- _ Kandang dibuat dengan kondisi sama

C. Variabel tergantung

Pengukuran kadar NO (Nitrit dan Nitrat) setelah pemberian ekstrak mengkudu pada hiperkolesterol

4.4. Definisi Operasional Variabel

- Hiperkolesterolemia : Merupakan suatu keadaan dimana kadar kolesterol tikus diatas normal (> 86 mg/dl)
- NO adalah mengukur kadar nitrit dan nitrat dalam plasma sebagai marker aktivitas nitric oxide sintase dan produksi nitric oxide dengan menggunakan reagen Griess.

4.5. Bahan dan instrumen penelitian

4.5.1. Hewan percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus Wistar jantan umur 3 bulan sehat berat badan sekitar 200 gram.

4.5.2. Bahan pakan dan minum

Pakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah berbentuk pellet diberikan secara ad libitum. Pakan yang diberikan ada 2 jenis

1. Pakan standar berupa pakan ayam jadi buatan PT. Charoen Phokphand Indonesia, Animal Feedmill Co. Ltd. (Kandungan lemak kasar 6,7694 %)
2. Pakan tinggi lemak dengan komposisi sebagai berikut (Kandungan lemak kasar 12,4863 %)

Bahan	Banyaknya dalam 1 kg bahan
Tepung jagung	225 gram
Tepung terigu	300 gram
Tepung kacang hijau	125 gram
Tepung ikan	150 gram
Lemak babi	200 gram

(Sumber: Rakwa, 1995).

Air minum yang digunakan adalah air bersih dari PDAM Surabaya yang diberikan secara adlibitum

4.5.3. Bahan Kimia

Reagen Griess (1g/l sulfanilamide, 25 g/l phosphoric acid, 0,1 g/l N-1 Naphtylenediamine), Zinc sulfate 300 g/l, Cadmium.

4.5.4. Instrumen

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Kandang Tikus, sonde lambung, spuit 5 ml, neraca analitik, plate mikrotiter, microplate rider, sentrifuge, Ellisa reader.

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1 Tahap Persiapan

Pada tahap persiapan , hewan coba diadaptasikan dengan kondisi lingkungan , pakandan minum adlibitum selama 1 minggu

4.6.2. Pembuatan Ekstrak Cair Mengkudu

Mengkudu dicuci diiris-iris tipis (0,5 cm) ditimbang sebanyak 300 gram kemudian dimasukkan dalam ekstraktor, hasil ekstraksi yang diperoleh sebanyak 100 ml. kemudian disentrifuge dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Hasil supernatan diambil 60 ml dan ditambahkan aqua sampai 100 ml maka dihasilkan estrak cair dengan kosentrasi 60 %.

4.6.3. Tahap Perlakuan

Seluruh hewan percobaan dibagi secara acak dalam 3 kelompok . Masing-masing kelompok terdiri dari 7 ekor tikus. Ekstrak mengkudu diberikan secara oral dengan menggunakan sonde lambung sehari sekali pada pagi hari sebelum pemberian pakan selama 2 bulan . Perincian mengenai perlakuan terhadap masing-masing kelompok adalah sebagai berikut :

P0 : Kontrol negatif yaitu kelompok tikus yang diberi pakan standar dan aquades 5 ml

P1 : Kontrol positif yaitu kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan aquades 5 ml

P2 : Kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak dan ekstrak mengkudu 60 % 5 ml

4.6.4. Pengambilan Sampel Darah

Sebelum pengambilan darah, hewan coba dipuasakan terlebih dahulu selama 12 jam tetapi air minum tetap diberikan. Hewan coba dianestesi dengan ether selanjutnya darah diambil dengan cara intra kardial sebanyak 1 ml

4.7. Pemeriksaan NO (Nitrit dan Nitrat)

Penentuan Nitrit

Menggunakan reaksi Griess

Plasma diencerkan 4 kali dengan air destilasi dan dihilangkan proteinnya dengan menambahkan 1/20 dari volume Zinci sulfat (300g/l) sampai konsentrasi akhir 15 g/l, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 g selama 5 menit pada suhu ruang (1000g selama 15 menit). Hasil dari sentrifugasi diambil 100 ul supernatannya kemudian dimasukkan dalam sumur plate mikrotiter. Ditambahkan 100 ul reagen griess pada setiap sumur plate mikrotiter. Tunggu 10 menit hingga terjadi perubahan warna merah pada suhu ruang. Absorbansinya diukur dengan mikroplate rider pada panjang gelombang 590 nm dan setiap sampel diukur 2 kali. Background values diamati dengan menggunakan sampel dan perlakuan yang sama tetapi reagen griess diganti dengan 25 g/l phosphoric acid.

Penentuan Nitrat

Nitrat diukur sebagai hasil reaksi antara nitrit dengan logam Cadmium. Hasil dari penentuan kadar nitrit pada semua sampel ditambahkan logam Cadmium

pada setiap sumur plate mikrotiter kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Sampel diambil dan dipindahkan pada microplate kosong dan dibaca pada ellisa reader dengan panjang gelombang 590 nm

4.8. Analisis data

Data hasil pengukuran kadar nitric oxide (Nitrit dan Nitrat) yang diperoleh dianalisa dengan dengan uji analisis varian (ANOVA). Bila terdapat perbedaan bermakna diantara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji LSD

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

Nitric oxide (NO) identik dengan EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*) yang merupakan faktor relaksasi pada otot polos. Nitric oxide dilepaskan oleh sel endotel sebagai persenyawaan kimia yang tidak stabil dengan waktu paruh hanya beberapa detik sehingga penentuan NO sangat sulit. Penentuan nitrit dan nitrat digunakan dalam kimia klinik sebagai marker untuk aktivitas NO sintase dan produksi nitric oxide (Moshage, 1995 ; Jaimes, 2001).

Dari hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan 21 ekor tikus jantan yang terbagi dalam tiga kelompok perlakuan, didapatkan hasil nilai *optical density* dari pemeriksaan kadar nitrit dan nitrat sebagai berikut :

Tabel 1: Nilai *Optical Density* (OD) Kadar Nitrit

Ulangan	Perlakuan		
	PO	P1	P2
1.	0,052	0,056	0,048
2.	0,069	0,051	0,039
3.	0,069	0,034	0,047
4.	0,055	0,047	0,063
5.	0,061	0,051	0,027
6.	0,067	0,021	0,049
7.	0,062	0,047	0,040
Rata-rata $\pm$ SD	0,062 ^a $\pm$ 0,067	0,043 ^b $\pm$ 0,012	0,047 ^b $\pm$ 0,011

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada ($p < 0,05$)

P0 : Kontrol

P1 : Kontrol pakan tinggi lemak

P2 : Pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %

Berdasarkan data hasil penelitian nilai *optical density* kadar nitrit dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5% didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan P0 (Kontrol) memiliki kadar nitrit yang tertinggi yang berbeda nyata dengan kelompok P1 (Pakan tinggi lemak) dan P2 (Pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) $p < 0,05$ sedangkan pada kelompok P1 (Pakan tinggi lemak) tidak berbeda nyata dengan kelompok P2 (pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) $p > 0,05$.

Hasil penelitian ini bisa dijelaskan bahwa adanya perbedaan pada kelompok P0 (kontrol) dengan kelompok P1 (Pakan tinggi lemak) yang ditunjukkan dengan hasil nilai *optical density*nya disebabkan karena pemberian pakan tinggi lemak merupakan salah satu penyebab hiperkolesterolemia yang merupakan faktor resiko atherosklerosis. Pada hiperkolesterolemia akan terjadi gangguan pada respon *endothelium dependent vasodilator* (EDR). Gangguan pada EDR akan mengakibatkan penurunan sintesis NO karena penurunan aktivitas ekspresi dari *endothelium Nitric Oxide Synthase* (eNOS) . Mekanisme penurunan sintesis NO disebabkan karena penurunan aktivitas dan ekspresi eNOS, penurunan sensitivitas otot polos pembuluh darah pada NO dan peningkatan degradasi NO oleh reaktif oksigen spesies superoksid yang mekanisme semuanya ini

memainkan peran penting pada penurunan sintesis NO pada atherosclerosis dan hiperkolesteolemia (Kawashima, 2004).

Pada keadaan hiperkolesterolemia akan terjadi peningkatan produksi superoksida yang akan dapat meningkatkan degradasi NO untuk menurunkan sintesis NO. Degradasi NO oleh superoksida merupakan mekanisme penting gangguan pada EDR. Hasil penelitian yang lain juga menjelaskan bahwa fungsi endothel berhubungan dengan bioaktivitas dari NO yang tergantung interaksinya dengan reactive oksigen spesies (ROS) khususnya superoksida. Reaksi NO dengan superoksida akan dihasilkan peroxynitrit (ONOO^-) yang merupakan reaktif nitrogen spesies. Superoksida dan ONOO^- meningkat pada dinding pembuluh darah hiperkolesterolemia. Peroxynitrit ini akan mengganggu fungsi endothel yang menyebabkan penurunan aktivitas eNOS. Reaksi dengan superoksida dapat menurunkan bioavailabilitas NO, gangguan fungsi vasomotor, peningkatan agregasi platelet dan peningkatan adhesi monosit dan leukosit pada endotel, proliferasi otot polos (Faraci, 2003; Muzaffar *et al*, 2003; Ungvari, 2003; Kawashima, 2004). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Nicholas (2004) menunjukkan interaksi antara NO dan superoksida pada penelitian *invitro* dan *invivo* menunjukkan peroxynitrit dapat mengoksidasi BH_4 yang merupakan kovaktor esensial untuk semua NO sintase dalam waktu singkat (menit) yang menimbulkan efek langsung pada aktivitas eNOS dan disfungsi endotel.

Gangguan pada endotel untuk melepaskan mediator vasodilatasi (NO) dapat disebabkan karena penurunan pembentukan, peningkatan degradasi, dan penurunan sensitivitasnya untuk membentuk NO. Pada hiperkolesterolemia adanya gangguan keseimbangan produksi NO dan peningkatan produksi radikal bebas seperti superoksida akan menyebabkan gangguan pada spasme pembuluh darah. Superoksida dapat

menginaktivasi NO dan menghambat sintesis prostasiklin sehingga dapat mengganggu keseimbangan antara faktor relaksasi dan kontraksi yang dilepaskan dari endotel (Sozmen *et al*, 1998).

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Inoue (1998) pemberian pakan tinggi lemak pada kelinci akan meningkatkan produksi superoksid dari xanthine oksidase hal ini akan dapat menjelaskan bahwa hiperkolesterolemia dapat mengganggu relaksasi yang tergantung endotel melalui inaktivasi *endotelium derived nitric oxide*. Hasil penelitian Sugihartuti dkk (2002) juga menunjukkan pada hiperkolesterolemia terjadi peningkatan kadar MDA (Malondialdehyde) dan “*Circulating Endothel* “ hal ini menunjukkan bahwa pada hiperkolesterolemia radikal superoksid mempunyai efek sitotoksik yang menyebabkan peroksidasi membrane phopolipid yang akan meningkatkan malondialdehyde sebagai produk hasil peroksidasi lipid dan kerusakan jaringan serta disfungsi sel endotel yang ditunjukkan dengan peningkatan pelepasan endotel pada sirkulasi.

Pada hasil penelitian ini pemberian peroral ekstrak mengkudu 60 % pada tikus putih yang diberi pakan tinggi lemak tidak menunjukkan perbedaan yang nyata dengan kelompok tikus yang diberi pakan tinggi lemak. Hasil ini menunjukkan bahwa secara statistik ekstrak mengkudu konsentrasi 60 % belum dapat meningkatkan kadar nitrit pada hiperkolesterolemia meskipun hasil penelitian ada peningkatan dari hasil nilai rata-ratanya, tetapi diduga adanya sedikit kenaikan nilai optical density sudah berpengaruh pada perubahan pada tingkat sel. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Boyle (2002) dan Taylor *et al* (2003) yang menjelaskan hubungan konsentrasi NO dengan apoptosis bahwa NO pada konsentrasi rendah dapat menghambat apoptosis. Kosentrasi

rendah NO berpotensi sebagai antiapoptosis yang bekerja melalui peningkatan siklus GMP atau S-nitrosasi dari enzim caspase dilain pihak konsentrasi NO yang tinggi akan memberikan efek toksik dan menginduksi apoptosis atau nekrosis yang bekerja secara independen atau melalui signal glucokortikoid. Hasil penelitian Sally (2003) menunjukkan bahwa infusa mengkudu 60 % dapat menurunkan kadar trigliserida, kadar kolesterol total dan LDL serta dapat menaikkan kadar HDL mencit yang diberi pakan tinggi lemak selama 1 bulan dan hasil penelitian Zaini (2003) menunjukkan bahwa infusa mengkudu dapat mencegah penebalan tunika media aorta mencit yang diberi pakan tinggi lemak.

Tabel 11 : Nilai *Optical Density* (OD) Kadar Nitrat

Ulangan	Perlakuan		
	PO	P1	P2
1.	0,684	0,670	0,663
2.	0,664	0,644	0,656
3.	0,652	0,659	0,657
4.	0,659	0,635	0,662
5.	0,664	0,668	0,712
6.	0,651	0,664	0,691
7.	0,660	0,667	0,685
Rata-rata $\pm$ SD	0,662 ^a $\pm$ 0,110	0,658 ^a $\pm$ 0,134	0,675 ^a $\pm$ 0,213

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada ($p < 0,05$)

P0 : Kontrol

P1 : Kontrol pakan tinggi lemak

P2 : Pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %

Berdasarkan data hasil penelitian nilai *optical density* kadar nitrat dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih kecil dari F tabel. Hasil tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan (P0, P1, P2) $p > 0,05$.

Meskipun tidak adanya pengaruh secara statistik pada nilai *optical density* kadar nitrat tetapi berdasarkan hasil *optical density* kadar nitrat pada kelompok P0 (kontrol) dan kelompok P2 (pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) menunjukkan hasil rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan kelompok P1 (Pakan tinggi lemak). Hal ini diduga perbedaan sedikit sudah dapat menyebabkan perubahan pada tingkat sel tetapi hasil ini masih membutuhkan penelitian lebih lanjut konsentrasi NO sampai berapa yang dapat menyebabkan perlindungan pada tingkat sel meskipun hasil penelitian Boyle (2002) dan Taylor (2003) menjelaskan hubungan konsentrasi NO dengan apoptosis bahwa NO pada konsentrasi rendah dapat menghambat apoptosis.

Tabel III: Nilai *Optical Density* (OD) Kadar Total Nitrit Nitrat

Ulangan	Perlakuan		
	P0	P1	P2
1.	0,736	0,726	0,711
2.	0,733	0,695	0,695
3.	0,721	0,693	0,704
4.	0,714	0,682	0,725
5.	0,725	0,719	0,739
6.	0,718	0,685	0,740
7.	0,722	0,714	0,725
Rata-rata $\pm$ SD	0,724 ^b $\pm$ 0,007	0,702 ^a $\pm$ 0,017	0,719 ^b $\pm$ 0,017

Keterangan : Superskrip yang berbeda pada kolom yng berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada ($p < 0,05$)

P0 : Kontrol

P1 : Kontrol pakan tinggi kolesterol

P2 : Pakan tinggi kolesterol + ekstrak mengkudu 60 %

Berdasarkan data hasil penelitian nilai *optical density* kadar total nitrit dan nitrat dengan pembacaan pada ellisa reader yang diperoleh, kemudian dianalisis dengan menggunakan analisis variant didapatkan F hitung lebih besar dari F tabel . Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang nyata diantara perlakuan. Kemudian dilanjutkan dengan uji LSD dengan taraf signifikansi 5 % didapatkan kesimpulan bahwa perlakuan P2 (Pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) dan P0 (Kontrol) memiliki kadar nitrit yang tertinggi yang berbeda nyata dengan kelompok P1 (Pakan tinggi lemak) $p < 0,05$ sedangkan P2 (Pakan tinggi lemak + ekstrak mengkudu 60 %) dengan kelompok P0 (kontrol) tidak berbeda nyata $p > 0,05$.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa adanya zat yang terkandung dalam buah mengkudu yang berkhasiat sebagai antihiperkolesterolemia dan antioksidan yang dimiliki seperti scopoletin, asam ascorbat, beta karoten dan xeronin dapat meningkatkan sekresi NO dengan peningkatan kadar total nitrit dan nitrat. (Solomon, 2000 : Sjahbana dan Ramadhani, 2002). Scopoletin mempunyai potensi sebagai antioksidan karena dapat menyekat atau menghambat oksidasi LDL. Asam ascorbat bersifat hidrofilik yang berperan dalam sitosol sel, bekerja sebagai koenzim dan pada keadaan tertentu dapat sebagai reduktor dan antioksidan. Asam ascorbat penting dalam memelihara kadar BH4. Suplemen asam askorbat pada perokok dapat memperbaiki fungsi endotel sedang pada hiperkolesterolemia dan diabetes dapat meningkatkan rasio BH4 dan bioavaibilitas NO dalam aorta. Asam askorbat dapat melindungi BH4 dari oksidasi oleh peroksinitrit. Reaksi

peroksinitrit dengan askorbat 10 kali lebih rendah dibandingkan dengan peroksinitrit dengan BH₄. Askorbat juga dapat bekerja dengan mereduksi BH₃ untuk membentuk BH₄ reaksi kinetiknya dengan kecepatan konstan $1,7 \times 10^{-5}$ mol/L/detik (Nicholas, 2004). Beta karoten berfungsi sebagai antioksidan yang bersifat lipofilik sehingga dapat berperan pada membran sel untuk mencegah peroksidasi lipid dengan cara menangkap radikal bebas peroksi didalam jaringan, beta karoten dapat juga mengurangi terjadinya oksidasi LDL dengan menurunkan sintesis LDL (Sjahbana dan Ramadhani, 2002). Xeronin merupakan salah satu alkaloid penting yang terdapat dalam buah mengkudu. Xeronine berfungsi untuk mengaktifkan enzim-enzim dan mengatur fungsi protein didalam sel (Waha 2001). Menurut Heinicke (2001), xeronin mempunyai aktivitas tinggi pada pembentukan protein untuk hormon, salah satunya hormon yang dihasilkan xeronin adalah insulin. Insulin merangsang sel adipose untuk mensekresi LPL yang dapat meningkatkan hidrolisis TG. Dijelaskan juga oleh Linder (1992) insulin dapat menyebabkan peningkatan jumlah resepor LDL hepatic dan ekstrahepatik.

Kandungan bahan aktif yang dimiliki mengkudu yang mempunyai potensi sebagai antihiperkolesterolemia dan antioksidan dapat dijelaskan bahwa kemampuan mengkudu dalam menurunkan kadar kolesterol akan dapat menurunkan kadar radikal superoksid yang akan memberikan efek hambatan terhadap degradasi NO yang pada akhirnya akan meningkatkan sekresi NO oleh endotel atau dengan kata lain perbaikan profil lipid juga akan dicapai perbaikan fungsi endotel (Bastari dkk, 2000). Hasil penelitian penurunan kadar kolesterol dan terapi dengan statin dapat merangsang endotel NO sintase untuk melepaskan NO dan dapat meningkatkan kandungan dari kolagen interstisial dan menekan pembentukan matrik metalloproteinase (MMP) yang berperan pada stabilitas plak

atherosclerosis (Kon Koh *et al*, 2002). Reaktif oksigen spesies seperti superoksida akan menyebabkan vasokonstriksi, kerusakan endotel, peningkatan ekspresi adhesi molekul dan inflamasi. Superoksida akan bereaksi dengan NO menghasilkan peroksinitrit ONOO- yang akan menurunkan bioavailabilitas NO. Pemberian ekstrak mengkudu 60 % dapat menghambat degradasi NO dengan ditunjukkan pada kelompok yang diberi pakan tinggi lemak dan ekstrak mengkudu 60 % memberikan hasil yang sama dengan kontrol yang tanpa perlakuan.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak mengkudu 60 % berpengaruh terhadap peningkatan sekresi NO (Nitrit dan Nitrat) pembuluh darah hiperkolesterolemia

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh ekstrak mengkudu terhadap kadar superoxide pembuluh darah hiperkolesterolemia
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh ekstrak mengkudu terhadap kadar TNF alfa yang merupakan sitokin proinflamasi yang berperan pada atherosclerosis pada hiperkolesterolemia
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pengaruh ekstrak mengkudu terhadap efek samping terhadap organ seperti hati, ginjal dan lambung pada dosis terapi pemberian jangka lama
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pemberian ekstrak mengkudu pada hewan kontrol yang tidak diberi perlakuan

DATAR PUSTAKA

- Alwi I, 1996, Peran Triad Lipid Pada Penyakit Jantung Koroner, Medika Desember. No. 12 Thn. XXII. Hal. 963-973
- Anggard E, 1994. Nitric Oxide : mediator, Murderer and Medicine. The Lancet, 343. May, 14. 1199-1205
- Bastari, Harimurti, Supari dan Rachman. 2000. Pengaruh Pemberian Terapi Hormon Pengganti Kombinasi Dosis Rendah Terhadap Kadar Nitric Oxide Pada Wanita Menopause. Jurnal Kedokteran Indonesia . Vol XXV. 177- 183.
- Boyle JJ. Weissberg PL, Bennett MR. 2002. Human Macrophage- Induced Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis Requires NO Enhancement of Fas/Fas-L Interactions. J. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology . 22 : 1624
- Busse R, Mulsch A, Fleming I, Hecker M, 1993. Mechanism Of Nitric Oxide Release From The Vascular Endothelium. Circulation. May. 87(5) ; V.18-25.
- Chowienzyk P, Ritter J 1997. Arginine : NO more than a simple amino acid ?. The Lancet, 350. Sep. 27.901
- Drexler H, 1996. Endothelial Function In Heart Failure ; Some Unsolved Issues. European Heart Journal. 17;1775-1777.
- Evans CH 1995. Nitric Oxide : what role does it play in inflammation and tissue destruction ? dalam inflammation Mechanism and Therapeutics. AAS 47.107-113.
- Evan CR, and Bruckdorfer KR, 1992. Free Radical, Lipoprotein And Cardiovascular Dysfunction. A.J.H. February. 8. Part 2.(5) : 28s-41s.
- Faraci FM. 2003. Hyperhomocysteinemia A Million Ways to Lose Control. Arterioscler Tromb Vasc Biol. 23 : 371-373.
- Flavahan NA and Vanhoutt PM. 1995. Endothelial Cell Signaling And Endothelial Dysfunction . AJH. February 8 part 2 (5) : 8s-41s
- Harliansyah (2002). Nitrogen Oksida dalam Pandangan Kimia dan Implikasinya Dibidang Biologi. J. Kedokteran Yarsi 78.
- Heincke. 1994. Anticancer Activity of Morinda citrifolia Intraperitoneal Implanted Lewis Lung Carcinoma in Syngenic Mice. Proc. West. Pharmacol .Soc

Inoue N, Ohara Y, Fukai T, Hariiirison and Nishida K . 1998. probucol Improves Endothelial –Dependent Relaxation and Decreases Vascular Superoxide production in Cholesterol fed Rabbit. . the American Journal Of The Medical Sciences. 315 : 4 : 242-246.

Jaimes EA, Castilo DD, Rutherford MS, Raj L. Countervailing Influence of Tumor Necrosis Factor Alfa and Nitric Oxide in Endotoxemia. J. Am Soc Nephrol 12 ; 1204-1210

Kawashima. 2004. Malfunction of Vascular Control in lifestyle –Related Diseases; Endothelial Nitric oxide (NO) Synthase/ NO System in atherosclerosis. J. of Pharmacological sciences.. Okt : 411-419

Kon Koh, Won Son, Yeal Ahn, Kyu Jin, Sik Kim, Mi Choi, 2002. Comparative effect of Diet and Statin on NO Bioactivity and Matrix Metalloproteinases in Hyperkolesterolemia Patients with Coronary Artery Disease. Atrterioscler Tromb Vasc Biol. 22 : e19- e23

Linder, M.C. 1992. Biokimia Nutrisi dan Metabolisme dengan Pemakaian secara Klinis. Edisi i. Alih bahasa : Aminudin Parakkasi. Penerbit Universitas Indonesia (UI – Press) , Jakarta. 27-656

Lukmanto. P. 1990. Kaitan Endotel dengan Penyakit Jantung Koroner. Pharos Buletin .

Luscher T and Boulanger CM, Yang Z, et al. 1993. Interactions Between Endothelium-Derived Relaxing and Contracting Factor in Health and Cardiovascular Disease. Circulation. May. 87(5): V 36-44.

Luscher TF, 1990. The Endothelium Target and Promoter of Hypertension. J. Hypertension. May. 15(5) : 482-485.

Luscher TF, Rubanyi GM, Masaki, et al. 1993. Introduction Endothelial Control of Vascular Tone and Growth. Circulation. May. 87(5) : V1-V2.

Lusher TF and Tanner FC, 1993. Endothelial Regulation of Vascular Tone and Growth. A.J.H. July. Part 2. 6(7) : 283S-293S.

Marks *et al* . 2000. Biokimia Kedokteran Dasar Sebuah Pendekatan Klinis. Edisi I. Penerbi buku Kedokteran EGC, Jakarta. 2-555

Meredith IT, Yeung AC, Weidinger FF, 1993. Role of Impaired Endothelium- Dependent Vasodilation in Ischemic Manifestation of Coronary Artery Disease. Circulation. May. 87 (5):V 56-66.

Murray Rk, Granner Dk. 2000. Harper's Biochemistry Edition 25 th. Mc Graw-Hill.

Muzaffar, Jeremy, Angelini, Stuart Smith, Shukla, 2003. Role of the Endothelium and Nitric Oxide Synthase in Modulating Superoxide Formation Induced by Endotoxin and Cytokines in Porcine Pulmonary Arteries. *Thorax* :58 ; 598-604.

Moshage, Bart Kok, Johannes, Huizenga Peter, Jansen. 1995. Nitrite and Nitrate Determination in Plasma : A Critical Evaluation. *Clinical Chemistry* : 41 : 6 : 892 - 896

Nicholas , 2004. Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase by Tetrahydrobiopterin in Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 24 : 413-420

Rakwa, I.w. 1995. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih Terhadap Kadar Kolesterol Total TG, LDL dan HDL Tikus (*Rattus Norvegicus*) Setelah Pemberian Pakan Tinggi Lemak. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair Surabaya

Sally. 2003 . Pengaruh Infus Mengkudu Terhadap Kadar Kolesterol Total TG, LDL dan HDL Mencit Setelah Pemberian Pakan Tinggi Lemak. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair Surabaya

Sjabana dan Ramadhani. 2002. Pesona Tradisional dan Ilmiah Mengkudu. Edisi I .Penerbit Salemba Medik. Jakarta 2-64

Solomon. 2000. Noni Juice. Home page. <http://home.cio.net/timo/sciencestudies.html>.

Sozmen B, Kazaz L, Taskiran D, Tuzun S, and Sozmen EY, 1998. Effect of N Dicycloprorylemethyl-amino-2-oxazoline (s-3341) on Antioxidant Status and Nitric Oxide in Hypertensive patients, *Current Medical Research and Opinion*. 14(2 : 89-96.

Sugihartuti R, Maslachah L. 2002 . Efek Perlindungan Endotel Oleh Ekstrak Air Bawang Putih (*Allium Sativum* Linn) Pada Hiperkolesterolemia. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga .

Taylor El, Megson IL, Haslett C, Rossi AG, .2003. Nitric oxide ; a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. Cell death and Differentiation. Nature publishing group. 10 : 418- 430.

Ungvari, Csistzar A, Edwards JG, Kamisinski PM, Wolin MS, Kaley G, Koller A, 2003. Increased Superoxide production in Coronary Arteries in Hyperhomocysteinemia. Role of Tumor Necrosis Factor alpha , NAD(P)H Oxidase and Inducible Nitric Oxide Synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 23 : 418-424

Vanhoutte PM. 1993. Other Endothelium Derived Vasoactive Factors. *Circulation*. May 87(5) V9-V17

Waha. 2001. Sehat dengan Mengkudu (*Morinda citrifolia* L. Cetakan II. MSF Group. Jakarta.

Wijayakusuma. 2002. Penyembuhan dengan Mengkudu (*Morinda citrifolia l*). Edisi Iii. Penerbit Milenia popular . Jakarta . 9-88.

Wilbraham, Michael, 1992. Pengantar Kimia Organik dan Hayati. Alih bahasa : Suminar a. Penerbit ITB bandung. 188-214.

Wu G and Morris S.M. Jr. 1998. Arginine Metabolism : Nitric Oxide and beyond. Biochem J, 336. 1-17.

Zaini. 2003 . Pengaruh Pemberian Infusum Buah Mengkudu Terhadap Gambaran Histopatologis Aorta Mencit Jantan yang Diberi Diet Tinggi Lemak. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Unair Surabaya

Lampiran 1 : Penghitungan Dosis Ekstrak Mengkudu

Diketahui :

Berat rata-rata tikus = 205 gram

Berat tikus dalam tabel = 200 gram

Nilai konversi manusia ke tikus = 0,018

Dosis pada manusia = 250 ml

Dosis pada tikus adalah $205/200 \times 0,018 \times 250 = 4,6125 = 5 \text{ ml}$

Lampiran 2. : Analisis Hasil Optical Density kadar Nitrit

Data Nitrit :

	P0	P1	P2
1.	.0520	.0560	.0480
2.	.0690	.0510	.0390
3.	.0690	.0340	.0470
4.	.0550	.0470	.0630
5.	.0610	.0510	.0270
6.	.0670	.0210	.0490
7.	.0620	.0470	.0400

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
P0	7	.0520	.0690	.062143	.0067436
P1	7	.0210	.0560	.043857	.0121714
P2	7	.0270	.0630	.044714	.0110862
Valid N (listwise)	7				

Oneway

ANOVA

VAR-2

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	2	.001	7.064	.005
Within Groups	.002	18	.000		
Total	.003	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR-2

LSD

(I) VAR-1	(J) VAR-1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.018286(*)	.0054905	.004	.006751	.029821
	3	.017429(*)	.0054905	.005	.005894	.028964
2	1	-.018286(*)	.0054905	.004	-.029821	-.006751
	3	-.000857	.0054905	.878	-.012392	.010678
3	1	-.017429(*)	.0054905	.005	-.028964	-.005894
	2	.000857	.0054905	.878	-.010678	.012392

* The mean difference is significant at the .05 level.

Lampiran 3 : nalisis Hasil Optical Density Kadar Nitrat

Data Nitrat :

	P0	P1	P2
1.	.6840	.6700	.6630
2.	.6640	.6440	.6560
3.	.6520	.6590	.6570
4.	.6590	.6350	.6620
5.	.6640	.6680	.7120
6.	.6510	.6640	.6910
7.	.6600	.6670	.6850

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
P0	7	.6510	.6840	.662000	.0110000
P1	7	.6350	.6700	.658143	.0134589
P2	7	.6560	.7120	.675143	.0213028
Valid N (listwise)	7				

Oneway

ANOVA

VAR-2

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	2	.001	2.207	.139
Within Groups	.005	18	.000		
Total	.006	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR-2

LSD

(I) VAR-1	(J) VAR-1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.003857	.0084850	.655	-.013969	.021683
	3	-.013143	.0084850	.139	-.030969	.004683
2	1	-.003857	.0084850	.655	-.021683	.013969
	3	-.017000	.0084850	.060	-.034826	.000826
3	1	.013143	.0084850	.139	-.004683	.030969
	2	.017000	.0084850	.060	-.000826	.034826

Lampiran 4 : Analisis Hasil Optical Density Kadar Total Nitrit dan Nitrat

Data Total Nitrit Nitrat :

	P0	P1	P2
1.	.7360	.7260	.7110
2.	.7330	.6950	.6950
3.	.7210	.6930	.7040
4.	.7140	.6820	.7250
5.	.7250	.7190	.7390
6.	.7180	.6850	.7400
7.	.7220	.7140	.7250

Descriptives

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
P0	7	.7140	.7360	.724143	.0079042
P1	7	.6820	.7260	.702000	.0174547
P2	7	.6950	.7400	.719857	.0171894
Valid N (listwise)	7				

Oneway

ANOVA

VAR-2

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	2	.001	4.371	.028
Within Groups	.004	18	.000		
Total	.006	20			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: VAR-2

LSD

(I) VAR-1	(J) VAR-1	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	.022143(*)	.0079440	.012	.005453	.038833
	3	.004286	.0079440	.596	-.012404	.020975
2	1	-.022143(*)	.0079440	.012	-.038833	-.005453
	3	-.017857(*)	.0079440	.037	-.034547	-.001167
3	1	-.004286	.0079440	.596	-.020975	.012404
	2	.017857(*)	.0079440	.037	.001167	.034547

* The mean difference is significant at the .05 level.