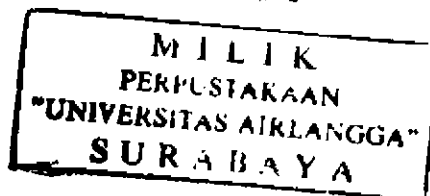


1. CAHESU...
ADLN - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA
2. 11.0011 ...

S K R I P S I



KKS
KK
FF 735/95
Dar
P

NI KETUT DARWATI

**PENGARUH PEMBERIAN ASAM NIKOTINAT
TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL DAN
KOLESTEROL HDL SERUM TIKUS PUTIH**
(Rattus norvegicus)



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
S U R A B A Y A
1995**

**PENGARUH PEMBERIAN ASAM NIKOTINAT
TERHADAP KADAR KOLESTEROL TOTAL DAN
KOLESTEROL HDL SERUM TIKUS PUTH
(*Rattus norvegicus*)**

SKRIPSI

Dibuat untuk memenuhi syarat-syarat mencapai
gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi

Universitas Airlangga

Surabaya

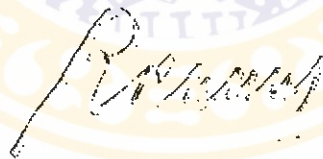
1995

Oleh :

Ni Ketut Darwati

059011228

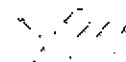
Disetujui Oleh :



(Dr. Purwanto)
Pembimbing Utama



(Drs. Bambang Tri Purwanto, MS)
Pembimbing Serta



(Ir. Rully Suslowati, MS)
Pembimbing Serta

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan karunia yang telah dilimpahkan-Nya kepada saya, atas terselesainya tugas skripsi, guna memenuhi syarat dalam mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dengan selesainya tugas skripsi ini, maka pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

- Bapak DR. Purwanto selaku pembimbing utama, serta Bapak Drs. Bambang Tri Purwanto, MS dan Ir. Rully Susilowati, MS selaku pembimbing serta, yang selalu bersedia memberikan bimbingan, saran, dan nasehat yang sangat berguna dalam penyusunan skripsi ini.
- Bapak Kepala Laboratorium Kimia Medisinal Fakultas Farmasi Universitas Airlangga atas segala fasilitas dan bantuan yang telah diberikan selama penelitian ini.
- Pengelola Unit Penunjang Hewan Percobaan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah banyak memberikan bantuan dan fasilitas selama penelitian ini.
- Segenap Karyawan Laboratorium Kimia Medisinal, Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan bantuan dalam penelitian ini.

- Keluarga tercinta yang senantiasa memberikan dorongan doa serta bantuan materiil.
- Rekan-rekan yang telah memberikan saran dan dorongan kepada penulis hingga terselesainya tugas skripsi ini.

Semoga semua pihak yang telah memberikan bantuan kepada penulis akan mendapat balasan dari Tuhan Yang Maha Esa, dan semoga skripsi ini dapat memberikan sumbangan yang bermanfaat bagi masyarakat, khususnya mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Surabaya, Januari 1995

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
RINGKASAN	x
BAB I. PENDAHULUAN	1
1. Latar Belakang Permasalahan	1
2. Permasalahan	4
3. Tujuan Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
1. Asam Nikotinat	5
1.1. Tinjauan umum	5
1.2. Sifat kimia fisika dan farmako- kinetik	7
1.3. Mekanisme kerja	8
2. Kolesterol	8
2.1. Sifat fisika kimia kolesterol	8
2.2. Kolesterol dalam tubuh	9
2.3. Absorpsi dan transpor kolesterol .	10
2.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar kolesterol dalam darah	11
2.5. Kolesterol HDL	12

2.6. Ekskresi kolesterol	14
3. Tinjauan Tentang Binatang Percobaan ...	15
4. Tinjauan Tentang Metode Liebermann- Burchard	15
4.1. Penentuan kadar kolesterol total .	15
4.2. Penentuan kadar kolesterol HDL ...	17
5. Tinjauan Tentang Spektrofotometri	18
6. Tinjauan Tentang Uji Validasi	19
6.1. Kelurusan dan trayek kelurusan ...	19
6.2. Sensitivitas	20
6.3. Presisi	20
6.4. Akurasi	20
BAB III. BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN	21
1. Bahan Penelitian	21
2. Alat-alat Yang Digunakan	21
3. Cara Kerja	22
3.1. Analisis kualitatif asam nikotinat.	22
3.2. Analisis kualitatif kolesterol ...	22
3.3. Hewan percobaan	23
3.3.1. Rancangan percobaan	24
3.4. Pemilihan dosis	25
4. Uji Validasi	26
4.1. Kelurusan	26
4.2. Sensitivitas	26
4.2.1. LOD (Limit of Detection) ..	26
4.2.2. LOQ (Limit of Quantitation)	27

	4.3. Presisi	27
	4.4. Akurasi	27
	5. Pembuatan Kurva Baku	28
	5.1. Pemilihan panjang gelombang maksimum	28
	5.2. Pembuatan kurva baku	29
	6. Pengambilan Sampel Darah	30
	7. Penentuan Kadar Kolesterol	30
	7.1. Penentuan kadar kolesterol total serum	30
	7.2. Penentuan kadar kolesterol HDL serum	32
	8. Analisis Data	33
BAB IV.	HASIL PENELITIAN	37
	1. Analisis Kualitatif	37
	1.1. Analisis kualitatif asam nikotinat	37
	1.2. Analisis kualitatif kolesterol	37
	2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ..	38
	3. Pembuatan Kurva Baku	40
	4. Uji Validasi	42
	4.1. Kelurusan	42
	4.2. Sensitivitas	42
	4.3. Presisi	43
	4.4. Akurasi	44
	5. Penentuan Kadar Kolesterol Total	45
	6. Penentuan Kadar Kolesterol HDL Serum ..	51

7. Penentuan Pola Kadar Kolesterol Total Serum	56
8. Penentuan Pola Kadar Kolesterol HDL Serum	59
BAB V. PEMBAHASAN	61
BAB VI. KESIMPULAN	70
BAB VII. SARAN	71
DAFTAR PUSTAKA	72
LAMPIRAN	

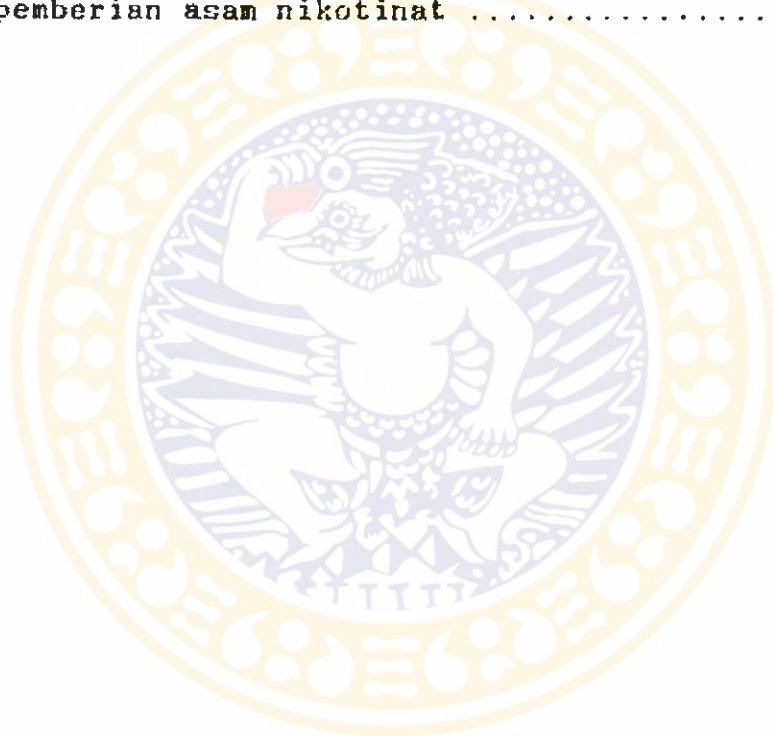


DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
I. Kandungan asam nikotinat pada beberapa makanan	6
II. Hasil analisis kualitatif asam nikotinat	37
III. Hasil analisis kualitatif kolesterol	37
IV. Hasil pengamatan serapan larutan baku kolesterol	40
V. Hasil pengamatan serapan blanko	43
VI. Penentuan presisi	43
VII. Penentuan akurasi	45
VIII. Hasil penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih	46
IX. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih kelompok I, II.1, II.2, II.3	47
X. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih kelompok III, IV.1, IV.2, IV.3	48
XI. Hasil penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih	51
XII. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih kelompok I, II.1, II.2, II.3	53
XIII. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih kelompok III, IV.1, IV.2, IV.3	55
XIV. Kadar kolesterol total serum rata-rata	57
XV. Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Kurva serapan larutan baku kolesterol 251,4 mg/dl dan 501,4 mg/dl terhadap panjang gelombang	39
2. Kurva linier nilai serapan terhadap kadar larutan kolesterol pada panjang gelombang maksimum 620,5 nm	41
3. Pola kadar kolesterol total serum tikus putih pada pemberian asam nikotinat	58
4. Pola kadar kolesterol HDL serum tikus putih pada pemberian asam nikotinat	60



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan koefisien korelasi	74
2. Penentuan LOD dan LOQ	76
3. Analisis data uji anakova untuk penentuan kolesterol total serum tikus putih	78
4. Analisis data uji anakova untuk penentuan kolesterol HDL serum tikus putih	84
5. Penentuan kestabilan reaksi warna dngan larutan baku kolesterol 501 mg/100 ml	88
6. Tabel harga koefisien korelasi pada derajat kepercayaan 5% dan 1%	89
7. Tabel distribusi F pada derajat kepercayaan 5%	90

RINGKASAN

Salah satu usaha untuk memperoleh gambaran tentang pengaruh dari asam nikotinat terhadap kadar kolestrol, dilakukan penelitian tentang pengaruh pemberian asam nikotinat terhadap kadar kolesterol total dan kadar kolesterol HDL serum tikus putih.

Pada penelitian ini digunakan 40 ekor tikus putih strain Wistar berjenis kelamin jantan yang dibagi menjadi 8 kelompok, masing-masing terdiri dari 5 ekor tikus. Kelompok-kelompok tersebut adalah :

- Kelompok I : makanan dasar
- Kelompok II.1 : makanan dasar + asam nikotinat dosis 1
- Kelompok II.2 : makanan dasar + asam nikotinat dosis 2
- Kelompok II.3 : makanan dasar + asam nikotinat dosis 3
- Kelompok III : makanan dasar + kolestrol 3% 1 ml
- Kelompok IV.1 : makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 1
- Kelompok IV.2 : makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 2
- Kelompok IV.3 : makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 3

Pemberian asam nikotinat dan suspensi kolesterol dilakukan secara per oral. Sebelum perlakuan dilakukan pemeriksaan kadar kolesterol total dan kolesterol HDL

serum. Kolesterol diberikan selama 1 minggu sebelum perlakuan untuk kelompok hiperkolesterolemia.

Perlakuan diberikan selama 4 minggu sesuai dengan kelompoknya. Setelah 4 minggu kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum diukur kembali. Pengambilan sampel darah secara intrakardial, sebelumnya hewan coba dipuasakan selama 12 - 24 jam.

Darah ditampung tanpa antikoagulan, serum yang diperoleh ditentukan kadar kolesterol total dan kolesterol HDL-nya secara metode Huang dan kawan-kawan dengan menggunakan pereaksi warna Liebermann-Burchard.

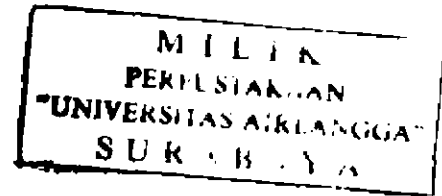
Untuk penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih, terlebih dahulu dilakukan teknik pengendapan selektif secara kimiawi untuk lipoprotein-lipoprotein lain selain HDL dengan menggunakan pereaksi Herapin dan Mangan klorida sebelum direaksikan dengan pereaksi Liebermann-Burchard.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada keadaan normal pemberian asam nikotinat dosis 1 (0,135 mg/g BB tikus) dan dosis 2 (0,315 mg/g BB tikus) meningkatkan kadar kolesterol total serum tetapi peningkatannya lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol. Pemberian dosis 3 (0,450 mg/g BB tikus) dapat menurunkan kadar kolesterol total serum. Sedangkan pada keadaan hiperkolesterolemia pemberian dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 dapat menurunkan kadar kolesterol total serum.

Pemberian asam nikotinat dosis 1, dosis 2 dan dosis 3, dapat meningkatkan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih baik dalam keadaan normal maupun keadaan hiperkolesterolemia.



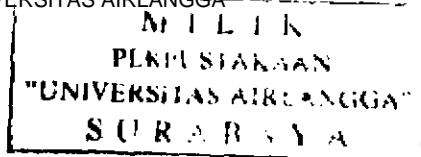
BAB I PENDAHULUAN



1. Latar Belakang Permasalahan

Di Indonesia, jumlah penderita penyakit jantung makin meningkat dari tahun ke tahun. Penyakit jantung koroner atau penyakit jantung aterosklerosis makin populer di kalangan masyarakat, khususnya bagi mereka yang tinggal di kota besar.⁽¹⁾ Pola hidup yang kebarat-baratan seperti menjamurnya restoran-restoran *fast food*, *hamburger*, *pizza*, dan lain-lain, cenderung mengurangi jumlah karbohidrat dan meningkatkan konsumsi kalori, lemak dan protein. Pola hidup seperti ini akan menimbulkan dampak negatif seperti hipertensi dan hiperkolesterolemia, yang merupakan faktor resiko utama terjadinya penyakit jantung koroner, di samping kebiasaan merokok.⁽²⁾

Kolesterol di dalam darah tidak beredar dalam keadaan bebas melainkan dalam partikel-partikel lipoprotein. Berdasarkan densitasnya lipoprotein plasma dapat dipisahkan dalam lima fraksi, yaitu : kilomikron, lipoprotein dengan densitas sangat rendah (VLDL : *very low density lipoprotein*), lipoprotein densitas rendah (LDL : *low density lipoprotein*), lipoprotein densitas sedang (IDL : *intermediate density lipoprotein*), dan lipoprotein densitas tinggi (HDL : *high density lipoprotein*). Kolesterol total dalam darah merupakan jumlah dari



kolesterol yang terdapat dalam partikel-partikel lipoprotein.⁽³⁾ Faktor resiko terjadinya penyakit jantung koroner apabila kadar kolesterol total darah lebih besar atau sama dengan 200 mg/dL.⁽⁴⁾ Kadar kolesterol LDL antara 130-159 mg/dL dianggap sebagai batas dan di atas 160 mg/dL dianggap mempunyai resiko tinggi terhadap timbulnya penyakit aterosklerosis. Kadar kolesterol HDL agar tidak terjadi penyakit ini cukup 35-65 mg%.⁽⁵⁾

Usaha pencegahan terhadap penyakit jantung koroner dapat dilakukan dengan berbagai cara terpadu, seperti pengendalian hipertensi, perbaikan diet, pengurangan merokok dan kenaikan aktivitas fisik.⁽⁶⁾ Perubahan diet merupakan pendekatan yang sering dilakukan.⁽⁴⁾

Makanan yang mengandung kolesterol dan lemak jenuh merupakan faktor diet utama yang mempengaruhi kadar lipoprotein dalam plasma.⁽²⁾ Kadar kolesterol darah dapat diturunkan dengan mengganti makanan dengan bahan yang mengandung lebih sedikit lemak jenuh dan kolesterol,⁽⁷⁾ penggantian diet dengan mengurangi jumlah kalori total dan pengurangan pemasukan lemak sampai 30% dari jumlah kalori total. Pemasukan kolesterol harus kurang dari 300 mg/hari.⁽⁵⁾

Asam nikotinat merupakan suplemen makanan yang diduga dapat menurunkan kadar kolesterol. Karena jumlah yang diperlukan relatif banyak, maka lebih dipandang sebagai obat dibandingkan sebagai makanan.⁽⁸⁾

Asam nikotinat merupakan salah satu vitamin yang larut dalam air dan terdistribusi secara luas dalam makanan nabati dan hewani. Makanan yang mengandung asam nikotinat meliputi daging, ikan, keju, sayuran, kacang-kacangan, susu, telur, kentang. Sejumlah asam nikotinat hilang selama pemasakan. Defisiensi asam nikotinat dalam waktu yang lama dapat menimbulkan penyakit pellagra. Penyakit ini timbul pada masyarakat dengan susunan makanan utama jagung. Di negara-negara bagian selatan Amerika dulu pellagra menjadi penyebab meninggalnya ribuan orang setiap tahun dan masih terjadi di sebagian Afrika, India dan Asia Tengah. Suapan harian yang dianjurkan adalah 18 mg ekuivalen untuk laki-laki dewasa dan 15 mg ekuivalen untuk wanita dewasa (18 mg ekuivalen selama kehamilan).⁽⁹⁾

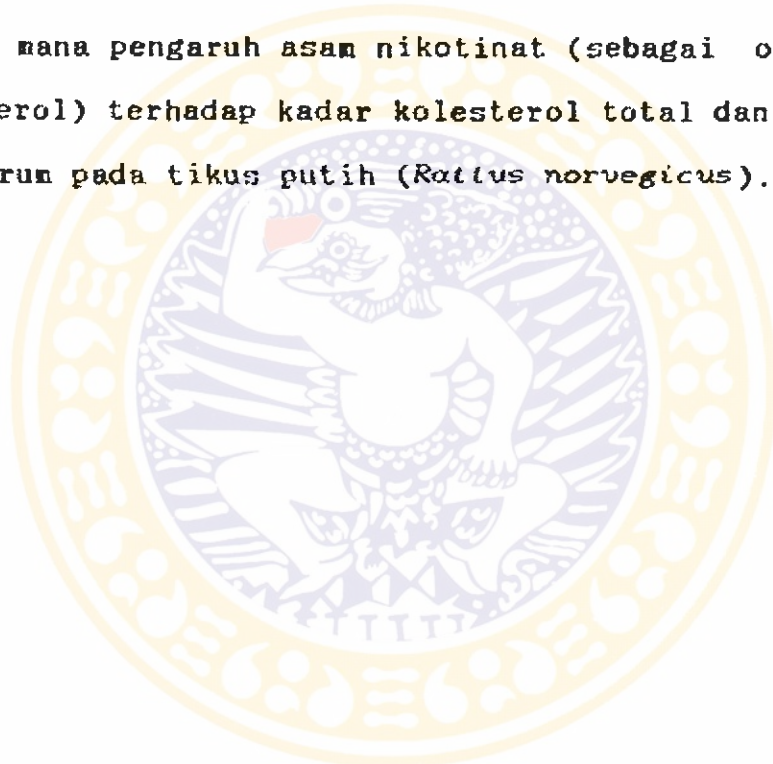
Dalam dosis besar asam nikotinat dapat menurunkan kolesterol plasma total, kolesterol LDL dan VLDL trigliserida, tetapi meningkatkan kolesterol HDL pada penderita dengan hiperlipoproteinemia tipe II, III, IV, dan V.⁽¹⁰⁾ Pada penderita dengan kadar kolesterol LDL tinggi asam nikotinat merupakan obat pilihan dengan mengurangi kecepatan sintesa LDL.⁽¹¹⁾ Kombinasi dengan Colesteramin pada penderita hiperkolesterol familial dapat mengurangi kadar LDL plasma sampai 32%, dan ratio LDL/HDL sampai 40%.⁽¹²⁾ Dosis 100 mg/hari pada tikus dapat meningkatkan HDL kolesterol.⁽¹³⁾

2. Permasalahan

Dari latar belakang permasalahan di atas, maka timbul pertanyaan bagaimanakah pengaruh asam nikotinat terhadap kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum.

3. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sejauh mana pengaruh asam nikotinat (sebagai obat hiperkolesterol) terhadap kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

1. Asam Nikotinat

1.1. Tinjauan umum

Asam nikotinat atau niasin, adalah suatu derivat piridin yang merupakan komponen tidak toksik dari nikotina.⁽¹⁴⁾ Sintesa pertama kali dari zat kimia murni dilakukan oleh Huber pada tahun 1867 dan diisolasi dari kulit beras oleh Funk pada tahun 1911.⁽¹⁵⁾ Tumbuhan dan sebagian besar binatang dapat mensintesa asam nikotinat dari asam amino triptofan, melalui piridoksal fosfat, suatu bentuk koenzim aktif vitamin B₆, atau piridoksin.⁽¹⁴⁾

Dalam sitosol sel, nikotinat mengalami fosforilasi membentuk nikotinat mononukleotida (NMN) yang kemudian mengalami adenililasi membentuk desamidonikotinamide dinukleotida (desamido NAD⁺) melalui ATP. Gugus amido glutamin kemudian melepaskan amidanya untuk membentuk koenzim nikotinamide dinukleotida (NAD⁺), suatu derivat NAD yang mengalami fosforilasi, nikotinamide dinukleotida fosfat (NADP⁺) juga bekerja sebagai suatu koenzim penting. Nukleotida niasin, NAD⁺ dan NADP⁺, bekerja sebagai koenzim pada sebagian besar reaksi oksidasi reduksi reversibel. Sifat sifat piridin nukleotida yang bertanggung jawab untuk reaksi oksidasi-reduksi karena bentuk hibrida atau

bentuk tereduksi dapat berada dalam bentuk multipel resonan sehingga relatif stabil.⁽¹⁴⁾

Defisiensi asam nikotinat dalam waktu yang lama menimbulkan penyakit yang dikenal sebagai "pellagra". Gejala penyakit ini meliputi diare, radang kulit dan dimentia atau kemerosotan mental, yang sering dikenal sebagai penyakit 3D (diare, dermatitis dan dimentia).⁽⁷⁾ Pellagra tidak hanya dihubungkan dengan defisiensi niasin tetapi juga triptofan dan piridoksin, karena setiap 60 mg triptofan hanya 1 mg asam nikotinat yang dapat disintesa secara aktif.⁽¹⁴⁾

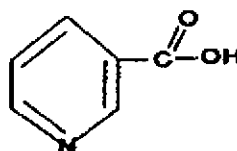
Sumber utama niasin adalah protein yang mengandung triptofan seperti daging, ikan, keju, sayuran, kacang-kacangan, dan padi-padian. Sebagian besar asam nikotinat dalam gandum hilang selama proses penggilingan. Tabel I menunjukkan kandungan asam nikotinat pada beberapa makanan.⁽⁹⁾

Tabel I. Kandungan asam nikotinat pada beberapa makanan.

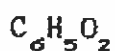
Bahan Makanan	mg asam nikotinat ekivalen per 100 g
Kacang garing	21,3
Hati	17,9
Daging sapi	7,2
Keju	6,2
Roti tawar	3,0
Ikan	4,9
Telur	3,7
Kentang	1,7
Susu	0,9
Bir	0,6

1.2. Sifat kimia fisika dan farmakokinetik

Asam nikotinat merupakan derivat piridin, dengan rumus struktur sebagai berikut :



Piridin 3 karboksilat



BM = 123,11

Asam nikotinat berupa serbuk kristal putih atau putih agak kelam, stabil, sedikit berbau atau hampir tidak berbau dengan rasa asam yang lemah. Larut dalam air (1 : 55-60), dalam alkohol (1 : 100), air mendidih dan alkohol mendidih, larut dalam alkali hidroksida dan karbonat, sangat sedikit larut dalam kloroform, praktis tidak larut dalam eter. Sedikit hilang dari makanan selama pemasakan.

Asam nikotinat mudah diabsorpsi dari usus halus dan didistribusikan secara luas ke jaringan tubuh, disimpan dalam jantung, hati dan jaringan, dengan waktu paruh yang pendek. Metabolit utama adalah N-metilnikotinamid dan derivat 2-piridon. Diekskresikan dalam urin dalam bentuk yang tidak berubah dan sebagai nikotinamid, N-metil-2-piridon-3-karboxamid, N-metil-2-piridon-5-karboxamid.

1.3. Mekanisme kerja

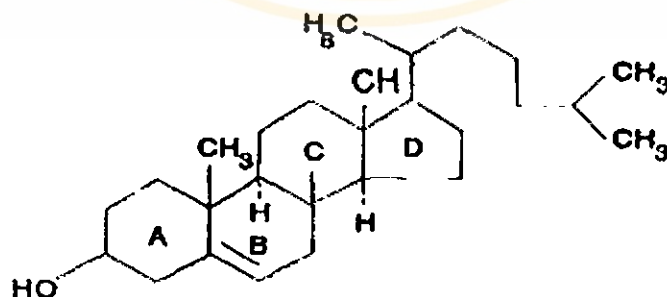
Asam nikotinat dapat menurunkan kadar kolesterol plasma melalui berbagai mekanisme yaitu :

- menghambat siklus Adenosine Monophosphate (AMP) sehingga terjadi akumulasi di jaringan adiposa, yang menurunkan aktivitas dari enzim triglicerida lipase. Hal ini akan menurunkan pelepasan asam lemak bebas oleh jaringan adiposa, dan menyebabkan penurunan pembentukan kolesterol VLDL dan LDL.⁽⁵⁾
- menghambat kecepatan katabolisme HDL, sehingga kadar kolesterol HDL di dalam plasma meningkat.⁽¹⁴⁾
- menghambat penyerapan kolesterol dari saluran cerna.⁽¹⁷⁾

2. Kolesterol

2.1. Sifat fisika kimia kolesterol

Kolesterol merupakan sterol penting yang mempunyai struktur dasar mirip fenantren. Rumus bangun kolesterol adalah sebagai berikut :



Kolesterol = Kolest-5 en-3 β -ol

$C_{27}H_{46}O$

BM = 386,7

Kolesterol merupakan serbuk atau granul halus, warna putih atau kekuningan, hampir tidak berbau, tidak larut dalam air, sukar larut dalam alkohol (1 : 100), larut dalam aseton, kloroform, dioksan, eter, etil asetat, petroleum eter, dan minyak tumbuhan.⁽¹⁶⁾

Kolesterol memberikan sejumlah reaksi warna yang karakteristik, antara lain dengan reaksi Liebermann-Burchard di mana larutan kolesterol dalam kloroform dengan penambahan asetat anhidrida dan asam sulfat pekat akan memberikan warna hijau kebiruan sampai hijau.

Reaksi ini merupakan dasar perhitungan kuantitatif, oleh karena intensitas warna yang diperoleh bervariasi sesuai dengan jumlah kolesterol yang ada. Reaksi warna yang lain dikembangkan oleh Salkowski (akhir abad 19), yaitu larutan kolesterol dalam kloroform dan asam sulfat pekat yang memberi warna merah kebiruan sampai violet.⁽¹⁸⁾

2.2. Kolesterol dalam tubuh

Kolesterol tersebar luas dalam semua sel tubuh. Bagian terbesar berasal dari sintesis sekitar 1 gram/hari, dan sekitar 0,3 gram/hari dilengkapi dari makanan. Sebenarnya semua jaringan yang mengandung sel berinti sanggup mensintesis kolesterol, khususnya hati, kortek adrenal, kulit, usus, testis, dan aorta. Fraksi mikroson dan sitosol sel bertanggung jawab untuk sintesis kolesterol. Bahan utama sintesis kolesterol adalah asetil

Ko-A. Sintesis kolesterol ini dapat disederhanakan menjadi 3 tahap :

- I. Perubahan asetil Ko-A menjadi asam mevalonat (termasuk pembentukan asetoasetil Ko-A, beta hidroksi glutaril Ko-A = HMG-Ko-A dan asam mevalonat).
- II. Perubahan asam mevalonat menjadi squalen (suatu hidrokarbon rantai panjang).
- III. Perubahan squalen menjadi kolesterol (rangkaiannya beberapa reaksi siklisasi)

Perubahan HMG Ko-A menjadi asam mevalonat merupakan reaksi yang menentukan pembentukan kolesterol dan dapat terjadi penghambatan kembali. Reaksi ini dikatalisa oleh enzim HMG Ko-A reduktasi, yang aktivitasnya terutama tergantung pada jumlah kolesterol diet yang diabsorpsi di usus halus dan ditransport ke hati. Mekanisme penghambatan kembali ini belum seluruhnya diketahui, tetapi diduga terjadi penghambatan sintesa enzim.⁽¹⁴⁾

2.3. Absorpsi dan transport kolesterol⁽¹⁴⁾

Kolesterol dalam makanan diserap dari usus dan bersama dengan lipid lain, termasuk kolesterol yang disintesis dalam usus, digabungkan dalam kilomikron dan VLDL. Dari kolesterol yang diserap, 80-90% di dalam getah bening diesterifikasikan dengan asam lemak berantai panjang. Esterifikasi dapat terjadi dalam mukosa usus. Sterol tumbuh-tumbuhan (sitosterol) sulit diserap. Pada

saat sisa kilomikron bereaksi dengan hati, banyak dari ester kolesterilnya dihidrolisis dan kolesterol diambil oleh hepar. VLDL yang dibentuk dalam hepar mengangkut kolesterol ke dalam plasma.

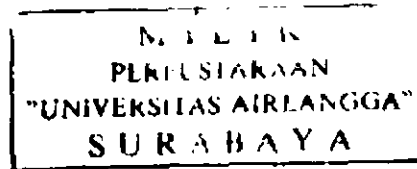
Sebagian besar kolesterol ditemukan dalam bentuk terestifikasi dan diangkut sebagai lipoprotein di dalam plasma. Lipoprotein ini merupakan partikel kompleks yang mengandung apoprotein, protein yang dapat mengikat lipida, dan membantu pengaturan dari hepar ke dalam plasma.

Keseimbangan ester kolesteril dengan kolesterol bebas dalam plasma memerlukan waktu yang cukup lama. Pada umumnya, kolesterol bebas mudah bertukar di antara jaringan dan lipoprotein, sedangkan ester kolesteril bertukar di antara lipoprotein-lipoprotein, hanya pada spesies yang memiliki protein pemindah ester kolesteril.

2.4. Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar kolesterol dalam darah

Adanya kolesterol sebagai salah satu faktor resiko terjadinya penyakit jantung koroner telah menyebabkan usaha-usaha untuk menurunkan kadar kolesterol dalam darah. Faktor-faktor penting yang mempengaruhi kadar kolesterol darah antara lain :⁽⁴⁹⁾

- Jumlah kolesterol yang dimakan, tidak dapat mengubah lebih dari $\pm 15\%$ konsentrasi kolesterol plasma,



walaupun kolesterol yang ekstrem dalam diet mungkin dapat mengubah kadar sampai $\pm 30\%$.

- Diet yang jenuh lemak meningkatkan konsentrasi kolesterol darah sebanyak 15-25%.
- Makan lemak yang mengandung banyak asam lemak tidak jenuh biasanya menekan konsentrasi kolesterol darah dalam jumlah ringan sampai moderat.
- Kekurangan hormon tiroid meningkatkan konsentrasi kolesterol darah, dan sebaliknya,
- Pada *diabetes mellitus* kolesterol darah sangat meningkat, diduga akibat dari peningkatan umum mobilisasi lipid.
- Hormon seks wanita, estrogen, menurunkan kolesterol darah, sedangkan hormon seks pria, androgen, meningkatkan kolesterol darah. Efek seks sangat penting karena makin tinggi kolesterol pada laki-laki dihubungkan dengan peningkatan insiden serangan jantung.
- Pada penyakit retensi ginjal kolesterol darah sangat meningkat diduga akibat penghambatan lipoprotein lipase, akibat pengurangan pembuangan lipoprotein dari plasma.

2.5. Kolesterol HDL

Kolesterol HDL mempunyai hubungan yang bersifat negatif dengan penyakit jantung koroner. Semakin tinggi

kadar HDL kolesterol dalam darah, semakin kecil kemungkinan untuk terjadi aterosklerosis. Korelasi ini tidak tergantung pada kadar trigliserida, tekanan darah, berat badan dan berlaku untuk pria maupun wanita.⁽¹⁴⁾ Korelasi HDL kolesterol dengan penyakit jantung koroner ini kuat, melebihi korelasi lipoprotein yang lain, sehingga HDL kolesterol dianggap sebagai faktor "anti resiko" yang lebih dapat diandalkan dalam meramalkan kemungkinan seseorang untuk menderita jantung koroner.⁽¹⁴⁾

Kolesterol HDL ini mempunyai peranan penting dalam homeostasis kolesterol dalam tubuh, dengan jalan mengambil kolesterol dari jaringan perifer, termasuk dinding arteria dan membawanya ke hati untuk diekskresi. HDL yang beredar dalam darah berasal dari sintesa hati dan usus, serta diduga sebagian berasal dari VLDL dan kilomikron. Lemak utama dari HDL kolesterol ini adalah kolesterol ester, kolesterol, trigliserida dan fosfolipida lesitin.⁽²⁰⁾

Faktor-faktor yang mempengaruhi kadar kolesterol HDL dalam darah antara lain :

- Jenis kelamin⁽¹⁴⁾
kadar HDL pada wanita lebih tinggi daripada pria
- Aktivitas/latihan fisik
latihan dapat menurunkan VLDL dan LDL, meningkatkan HDL⁽²¹⁾
- Kafein dan kebiasaan merokok
dapat meningkatkan LDL dan menurunkan HDL^(17,21)

- Vitamin C

terapi vitamin C menyebabkan penurunan LDL dan kolesterol total, dan peningkatan HDL⁽²¹⁾

- Alkohol

konsumsi alkohol yang tidak berlebihan dapat meningkatkan kadar HDL⁽²¹⁾

- Mineral

defisiensi tembaga menyebabkan peningkatan kadar LDL plasma dan penurunan kadar HDL⁽²¹⁾

- Vitamin E⁽¹⁹⁾

menpertahankan kadar HDL kolesterol.

2.6. Ekskresi kolesterol

Kira-kira separuh kolesterol yang dibuang dari tubuh diekskresi dalam feses setelah diubah menjadi garam empedu. Sisanya diekskresi sebagai steroid netral. Sebagian besar dari kolesterol yang disekresi dalam empedu direabsorpsi, dan dipercaya bahwa kolesterol yang berfungsi sebagai prekursor sterol feses berasal dari mukosa usus. Koprostanol adalah sterol utama di dalam feses.

Sebagian besar garam empedu dari ekskresi bilier direabsorpsi ke dalam sirkulasi portal, diambil oleh hati, dan diekskresi kembali ke dalam empedu, melalui sirkulasi enterohepatik. Garam empedu yang tidak direabsorpsi atau turunannya, diekskresi dalam feses.⁽¹⁴⁾

3. Tinjauan Tentang Binatang Percobaan

Binatang percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* Strain Wistar) jantan umur 2-3 bulan dengan berat badan 200-300 gram.⁽²²⁾ Binatang ini lebih umum digunakan sebagai binatang percobaan dalam laboratorium untuk pekerjaan penelitian, sebab ukurannya relatif kecil dan mempunyai sensitivitas yang tinggi terhadap sebagian besar obat. Kelebihan lain dari binatang ini adalah bagian tubuhnya yaitu lambung mempunyai kemiripan anatomi dan fungsi dengan manusia. Tikus putih merupakan binatang omnifora di mana nutrisinya mirip dengan nutrisi manusia.⁽²³⁾ Alasan lain dipilihnya tikus sebagai binatang percobaan adalah :⁽²⁴⁾

- biaya relatif murah
- pemeliharaan lebih mudah
- tidak memerlukan tempat pemeliharaan yang luas.

4. Tinjauan Tentang Metode Liebermann-Burchard

4.1. Penentuan kadar kolesterol total

Penentuan kadar kolesterol total dengan metode Liebermann-Burchard pertama kali ditemukan oleh Liebermann pada tahun 1885 dan tidak lama kemudian oleh Burchard digunakan untuk analisis kolesterol. Pada awalnya digunakan kloroform sebagai pelarut, tetapi reaksi Liebermann-Burchard sekarang menggunakan asam asetat-asam sulfat-asetat anhidrida.⁽²⁴⁾

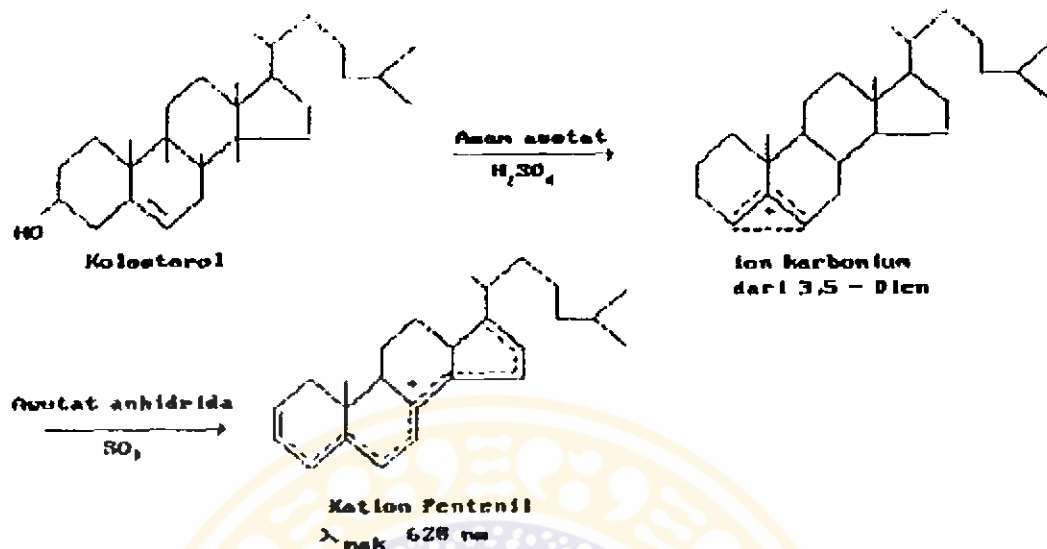
Metode lain yang banyak digunakan adalah reaksi Zak yang digunakan pertama kali pada tahun 1953 oleh Zlatkis, Zak dan Boyle untuk analisis kolesterol, menggunakan asam asetat-asam sulfat tanpa asetat anhidrida. Untuk mendapatkan warna yang diinginkan harus ditambah Fe^{3+} .⁽²⁴⁾

Metode Huang dan kawan-kawan yang menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan metode lain. Keuntungan metode ini antara lain :⁽²⁴⁾

- prosedur pelaksanaannya relatif mudah
- hanya menggunakan satu pereaksi warna dan pemeriksaan bisa dilakukan secara langsung
- pereaksi yang digunakan stabil selama 2 minggu pada suhu kamar dan 4 minggu di dalam lemari es
- reaksi warna maksimum sudah terbentuk selama 20 menit dan warna yang terjadi tetap stabil
- faktor suhu tidak begitu mempengaruhi reaksi warna, pemeriksaan antara suhu 21-25°C tidak memberikan hasil yang berbeda.

Prinsip reaksi Liebermann-Buchard menurut metode Huang dan kawan-kawan yaitu berdasarkan sifat kolesterol yang dapat bereaksi dengan asam kuat membentuk senyawa kolestapoliene yang berwarna hijau biru. Kadar senyawa kolestapoliene ini dapat diukur secara kolorimetri atau spektrofotometri.⁽²⁷⁾

Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



4.2. Penentuan kadar kolesterol HDL

Kolesterol HDL ditentukan dengan metode pengendapan selektif menggunakan heparin dan mangan klorida. Prinsip dari metode ini adalah pengendapan lipoprotein serum kecuali HDL. Kesempurnaan pengendapan merupakan faktor yang mempengaruhi metode ini.⁽²⁷⁾

Metode pengendapan selektif ini berdasarkan pada sifat lipoprotein (selain HDL), yaitu kemampuan bereaksi dengan polianion (heparin) dan kation bervalensi dua (Mn^{2+}), membentuk partikel kompleks yang tidak larut. Semakin besar molekul polianion atau molekul lipoproteinnya, akan semakin besar kecenderungan terbentuk kompleks. Maka dengan memilih pereaksi yang sesuai, dapat dilakukan pengendapan selektif terhadap lipoprotein.

Frakasi HDL yang terlarut ditentukan kadarnya seperti pada penentuan kadar kolesterol total. Metode ini adalah : lipoprotein-lipoprotein di dalam serum kecuali HDL diendapkan. Dua tahapan yang harus dilakukan pada penentuan kadar kolesterol HDL yaitu tahap pengendapan dan tahap penentuan kadar kolesterol HDL. Oleh karena itu faktor yang mempengaruhi metode ini adalah tergantung pada kesempurnaan dari pengendapan lipoprotein-lipoprotein selain HDL. ⁽²⁵⁾

5. Tinjauan tentang spektrofotometri

Metode spektrofotometri adalah salah satu metode instrumental yang didasarkan atas pengukuran serapan dari molekul terhadap sinar. Metode spektrofotometri dapat digunakan untuk analisa kualitatif dan kuantitatif. Jika pada panjang gelombang tertentu suatu zat mempunyai serapan yang spesifik, maka metode spektrofotometri dapat digunakan untuk penentuan identifikasi zat tersebut. Untuk analisa kuantitatif didasarkan pada nilai serapan pada panjang gelombang tertentu. ⁽²⁶⁾

Pengukuran serapan biasanya dilakukan pada panjang gelombang maksimum. Pada pengukuran serapan suatu larutan hampir selalu digunakan blanko untuk koreksi serapan yang disebabkan oleh pelarut, pereaksi, sel ataupun pengaturan alat. ⁽²⁷⁾

Analisis kuantitatif dengan spektrofotometri didasarkan pada hukum Lambert-Beer yaitu :⁽¹⁹⁾

$$A = a \cdot b \cdot c$$

di mana : A = serapan

a = daya serap

b = tebal medium

c = kadar senyawa untuk yang menyerap

6 Tinjauan Tentang Uji Validasi

Validasi dari suatu metode analisis adalah suatu proses untuk meyakinkan bahwa karakteristik dari metode memenuhi persyaratan untuk diterapkan pada analisis yang dimaksud. Parameter dari metode analisis yang dipakai sebagai pedoman untuk pengujian mutu adalah presisi, akurasi, sensitivitas, selektivitas, kelurusan dan ketidakrataan.⁽³¹⁾

Yang dilakukan dalam penelitian adalah kelurusan, sensitivitas, presisi dan akurasi.

6.1. Kelurusan dan trayek kelurusan

Kelurusan suatu metode analisis adalah kemampuan memberikan hasil uji yang secara langsung atau melalui transformasi matematik, sebanding dengan konsentrasi analit dalam sampel dengan rentang yang diberikan. Linieritas suatu metode analisis diperoleh dengan melaku-

kan penyelesaian matematik terhadap hasil-hasil analisis terhadap sampel dengan berbagai kadar analit. Trayek kelurusan adalah jarak dari yang terendah sampai yang tertinggi yang masih sesuai dengan hukum yang berlaku.⁽⁹¹⁾

6.2. Sensitivitas

Sensitivitas dinyatakan dengan LOD (*Limit of Detection*) untuk analisis kuantitatif dan LOQ (*Limit of Quantitation*) untuk analisis kuantitatif. LOD adalah batas kadar terkecil dari analit (zat yang dianalisis) dalam sampel yang masih bisa dideteksi. LOQ adalah batas terkecil dari analit dalam sampel yang ditetapkan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima.⁽⁹¹⁾

6.3. Presisi

Presisi adalah suatu derajat kinerulangan dari metode analisis pada kondisi pelaksanaan yang normal. Biasanya dinyatakan dengan simpangan baku relatif atau disebut juga koefisien variasi. Makin kecil harga prosen koefisien variasi maka makin baik presisi suatu metode analisis.⁽⁹¹⁾

6.4. Akurasi

Akurasi adalah kedekatan hasil yang diperoleh dari suatu metode analisis dengan kadar yang sebenarnya. Biasanya dinyatakan dengan prosen perolehan kembali.⁽⁹¹⁾

BAB III

BAHAN, ALAT, DAN METODE PENELITIAN

1. Bahan

- Asam nikotinat p.a. (E Merck)
- Kolesterol p.a. (E. Merck)
- Asam asetat glasial p.a. (E. Merck)
- Asetat anhidrida p.a. (E. Merck)
- Asam sulfat pekat p.a. (Riedel de Haen UN No. 1830)
- Natrium sulfat anhidrida p.a. (Farak Art-Nr 01170)
- Heparin (Leo)
- Mangan klorida anhidrida p.a. (E. Merck)
- Natrium hidroksida p.a. (E. Merck)
- Kalium hidroksida p.a. (E. Merck)
- Tembaga sulfat p.a. (E. Merck)
- Kloroform
- Eter

2. Alat-alat yang digunakan :

- alat-alat gelas
- alat suntik 3 ml
- mikro pipet 100 μ l , 200 μ l
- pipet volume
- tabung pemusing
- alat pencatat waktu
- kandang tikus dan perlengkapannya

- timbangan binatang
- spektrofotometer (Hitachi 557, dual wavelenght, double beam spectrophotometer)
- timbangan analitik

3. Cara Kerja

3.1. Analisis kualitatif asam nikotinat ⁽³²⁾

- Organoleptis
- Dilarutkan sekitar 0,05 gram asam nikotinat di dalam 10 ml larutan natrium hidroksida 0,1 N. Ditambah 1,5 ml asam asetat encer dan 3 ml tembaga sulfat, akan terbentuk endapan biru secara perlahan-lahan.
- Penentuan Titik Lebur
Zat digerus halus, dimasukkan ke dalam kapiler. Diamati suhu zat mulai melebur sampai melebur sempurna.

3.2. Analisis kualitatif kolesterol ⁽¹⁸⁾

- Organoleptis
- Larutan dalam kloroform ditetesi asetat anhidrat dan asam sulfat pekat, terbentuk warna hijau kebiruan.
- Penentuan Titik Lebur
Zat digerus halus, dimasukkan ke dalam kapiler. Diamati suhu zat mulai melebur sampai melebur sempurna.

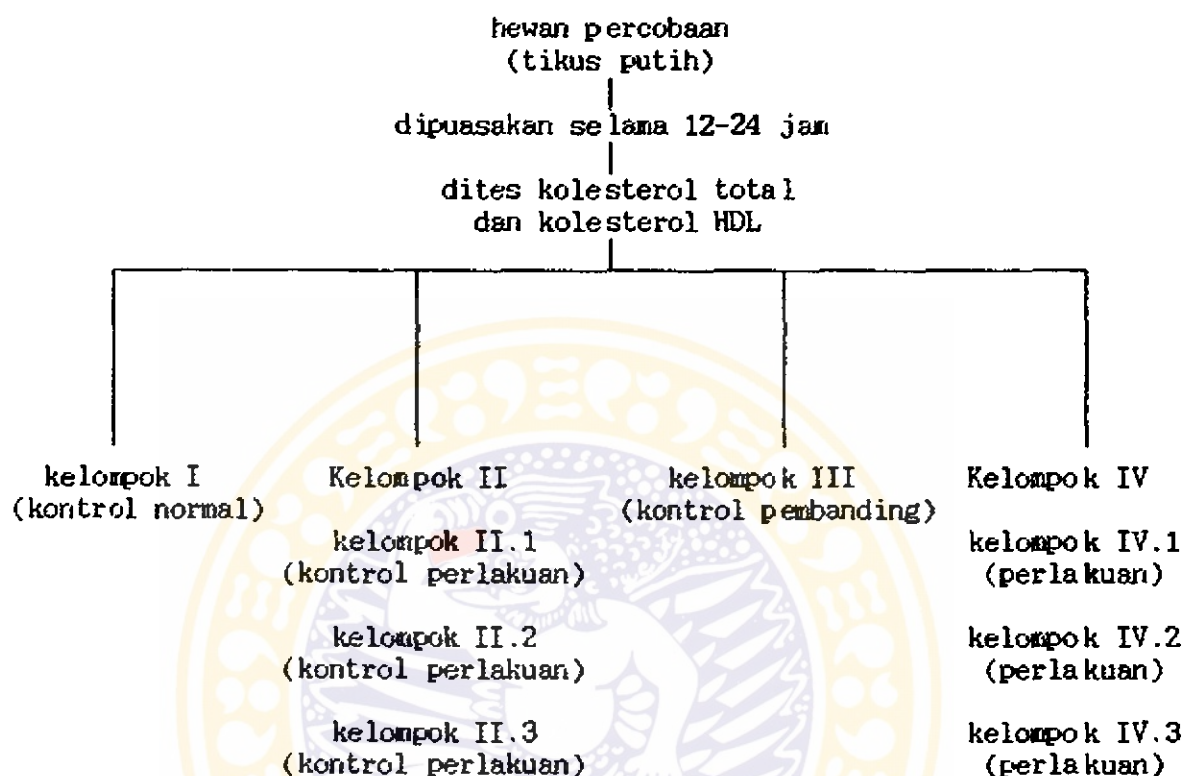
3.3. Hewan percobaan

Dalam penelitian ini digunakan tikus putih yang diperoleh dari Universitas Gajah Mada, dengan kriteria sebagai berikut :

- berjenis kelamin jantan
- berasal dari satu strain (*strain Wistar*)
- berumur 2-3 bulan
- bobot badan 200-300 gram
- berada dalam keadaan normal dan sehat

Pada penelitian ini dibutuhkan 40 ekor tikus putih, pada awal percobaan dikelompokkan ke dalam 8 bagian dengan masing-masing kelompok 5 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*).

3.3.1. Rancangan percobaan



Keterangan :

- I. Kontrol normal : diberi makanan dasar (pellet Par-G)
- II.1. Kontrol perlakuan : diberi makanan dasar + asam nikotinat dosis 1
- II.2. Kontrol perlakuan : diberi makanan dasar + asam nikotinat dosis 2
- II.3. Kontrol perlakuan : diberi makanan dasar + asam nikotinat dosis 3
- III. Kontrol pembandingan : diberi makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml
- IV.1 Perlakuan : diberi makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml + asam nikotinat dosis 1
- IV.2 Perlakuan : diberi makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml + asam nikotinat dosis 2
- IV.3 Perlakuan : diberi makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml + asam nikotinat dosis 3

Kolesterol diberikan selama 1 minggu sebelum perlakuan dalam bentuk suspensi dengan zat pensuspensi CMC-Na 1%. Masing-masing tikus diperlakukan sesuai dengan kelompok dengan pemberian secara per oral. Sebagai air minum diberikan air yang berasal dari sumber PAM tanpa diproses lebih lanjut. Diet diberikan kepada masing-masing tikus selama 1 minggu. Pada awal sebelum penelitian dilakukan pengambilan sampel darah dengan terlebih dahulu tikus dipuasakan selama 12-24 jam, tetapi minum tetap diberikan. Demikian juga pada akhir penelitian, juga diambil sampel darah.

3.4. Pemilihan dosis

Dosis asam nikotinat yang digunakan merupakan dosis yang digunakan untuk subyek manusia hiperkolesterol yang dikonversikan pada binatang percobaan. Nilai konversi untuk tikus dengan berat badan 200 gram adalah 0,018.⁽²⁹⁾ Besarnya dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

Dosis yang digunakan apabila seseorang menderita hiperkolesterol adalah 1,5-3,5 gram/hari. Sedangkan untuk melihat pengaruh peningkatan dosis dipakai dosis 5 gram/hari.

$$\begin{aligned} - \text{Dosis yang setara } 1,5 \text{ gram} &= (1,5 \text{ g} \times 0,018) : 200 \text{ g} \\ &\text{asam nikotinat} \\ &= 0,135 \text{ mg/g BB tikus.} \end{aligned}$$

Dengan cara yang sama untuk dosis yang setara 3,5 gram dan 5 gram asam nikotinat didapat 0,315 mg/g BB tikus dan 0,450 mg/g BB tikus.

4. Uji Validasi Metode Penelitian

4.1. Kelurusan

Ditentukan dengan mengukur serapan larutan baku dengan kadar 100,0 ppm; 250,0 ppm; 500,0 ppm; 1000,0 ppm; 2000,0 ppm; 3000 ppm; 4000,0 ppm dan 5000,0 ppm.

Kelurusan didapatkan dari perhitungan persamaan garis regresi.

$$r = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

di mana :

- r = koefisien korelasi
- x = kadar zat dalam larutan
- y = serapan yang terbaca

Setelah diperoleh bentuk linier di mana harga $r_{hitung} > r_{tabel}$, yang berarti ada korelasi linier antara kadar kolesterol dengan nilai serapannya, maka dicari :

Persamaan garis : $y = bx + a$

4.2. Sensitivitas⁽³¹⁾

4.2.1. L O D (Limit of Detection)

Harga LOD ditentukan dengan cara mengukur serapan-serapan blanko sebanyak 10 kali, kemudian dihitung simpangan bakunya. Simpangan baku dikalikan dengan 3,

kemudian hasilnya dimasukkan ke dalam persamaan kurva baku sehingga didapat kadar terkecil yang dapat terdeteksi.

4.2.2. L O Q (Limit of Quantitation)

Karga LOQ ditentukan dengan cara perhitungan yang sama dengan penentuan LOD, tetapi simpangan baku dikalikan dengan 10.

4.3. Presisi⁽³¹⁾

Harga presisi didapatkan dengan mengamati serapan larutan kolesterol pada kadar 2000,0 ppm sebanyak 10 kali. Kemudian dihitung perbandingan s dengan \bar{x} atau dengan prosen koefisien variasi.

$$\%KV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Keterangan :

x = kadar sampel

\bar{x} = kadar sampel rata-rata

n = jumlah sampel

s = simpangan baku

4.4. Akurasi⁽³¹⁾

Akurasi diperoleh dengan cara : serum ditambah larutan baku dengan kadar 1000,0 ppm; 2000,0 ppm; 2500,0 ppm dan 3000,0 ppm, kemudian larutan campuran diukur kadarnya. Perbandingan antara kadar sampel ter-

hitung dengan kadar sampel yang sebenarnya dinyatakan dengan prosen perolehan kembali (% recovery) dengan persamaan :

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_x - C_A}{C_B} \times 100\%$$

di mana : C_A = kadar serum mula-mula

C_B = kadar larutan baku yang ditambahkan

C_x = kadar serum ditambah larutan baku.

5. Pembuatan Kurva Baku

Pada penelitian ini diperlukan beberapa larutan baku dengan kadar 100,0 ppm, 250,0 ppm, 500,0 ppm, 1000,0 ppm, 2000,0 ppm, 2500,0 ppm, 3000,0 ppm, 4000,0 ppm, 5000,0 ppm, dengan pembuatan sebagai berikut :

- Ditimbang dengan seksama kolesterol sesuai dengan berat masing-masing, dimasukkan ke dalam labu ukur kemudian ditambah dengan asam asetat glasial sampai garis tanda dan dikocok sampai homogen.

5.1. Pemilihan panjang gelombang maksimum

Pada pemilihan panjang gelombang maksimum digunakan larutan baku kerja 2500,0 ppm dan 5000,0 ppm. Pelaksanaannya sebagai berikut :

- Dipipet 0,2 ml larutan baku kerja dengan mikro pipet dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi pereaksi warna Liebermann-Burchard yang sebelumnya

tabung direndam dalam air es, kemudian dikocok sampai homogen dan dibiarkan 30 menit pada suhu kamar, dimasukkan ke dalam kuvet dan dibaca serapannya pada panjang gelombang 540 - 700 nm, dicari panjang gelombang maksimum dengan alat spektrofotometer. Sebagai titik nol digunakan blanko aquadest ditambah pereaksi warna Liebermann-Burchard yang selanjutnya diperlakukan sama dengan larutan baku kerja kolesterol.

5.2. Pembuatan kurva baku

Kurva baku dibuat dari larutan baku kerja kolesterol dalam asam asetat glasial dengan kadar 100,0 ppm; 250,0 ppm; 500,0 ppm; 1000,0 ppm; 2000,0 ppm; 3000,0 ppm; 4000,0 ppm; 5000,0 ppm. Masing-masing larutan baku kerja tersebut direaksikan seperti pada (5.1) dan dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimum yang didapat dari percobaan (5.1), akan diperoleh persamaan garis regresi dan koefisien korelasinya. Sebagai titik nol digunakan larutan blanko dengan menggunakan aquadest ditambah pereaksi Liebermann-Burchard, yang selanjutnya diperlakukan sama dengan larutan baku kerja kolesterol.

6. Pengambilan Sampel Darah⁽³⁴⁾

Sebelum dilakukan pengambilan sampel darah, tikus yang akan diambil darahnya dipisahkan dalam tempat tersendiri dan dipuaskan selama 12 - 24 jam sebelumnya dan minum tetap diberikan seperti biasanya. Masing-masing tikus yang akan diambil darahnya secara intra kardial dianestesi dengan inhalasi eter (aether anaestheticus) dengan diperkirakan tercapainya irama pernafasan yang teratur. Setelah tikus ditelentangkan dengan posisi dada di depan, kemudian raba bagian jantung yang memberikan denyut terkuat. Dengan menggunakan alat suntik, darah diambil sebanyak 3 ml, kemudian darah dipindahkan ke dalam tabung pemusing tanpa antikoagulan. Darah yang terkumpul dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar dan kemudian dipusingkan selama 20 menit, sehingga serumnya terpisah. \pm 1,5 ml serum yang telah terpisah ini dimasukkan ke dalam botol yang tertutup rapat, selanjutnya dilakukan pemeriksaan kimiawi.

7. Penentuan Kadar Kolesterol

7.1. Penentuan kadar kolesterol total serum⁽²⁶⁾

Kadar kolesterol total serum ditentukan menurut metode Huang dan kawan-kawan dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard. Metode ini menggunakan satu pereaksi warna yang dibuat dengan cara sebagai berikut :

Ke dalam bejana yang direndam dalam air es, dimasukkan asam asetat glasial p.a., asetat anhidrida p.a., asam sulfat pekat p.a. dengan perbandingan 3 : 6 : 1, yang dicampur sampai homogen. Kemudian ditambahkan ke dalamnya 2% natrium sulfat anhidrida p.a., kemudian dikocok sampai homogen.

Penentuan kadar kolesterol total serum dilakukan dengan cara sebagai berikut :

Ke dalam tabung-tabung reaksi yang berisi 5 ml pereaksi Liebermann-Burchard, di mana sebelumnya tabung direndam dalam air es, dimasukkan dengan hati-hati masing-masing 0,2 ml serum. Untuk larutan blanko digunakan aquadest ditambah pereaksi Liebermann-Burchard. Campuran dikocok sampai merata, kemudian dibiarkan 30 menit pada suhu kamar. Serapan dari masing-masing larutan tersebut dibaca dalam waktu 20 menit pada panjang gelombang maksimum yang terpilih, dengan menggunakan alat spektrofotometer.

Perhitungan :

Untuk menghitung kadar kolesterol total, dihitung dengan menggunakan persamaan garis regresi yang diperoleh dari percobaan (5.2).

Catatan :

Sebelum hewan percobaan mengalami perlakuan, maka dilakukan dulu tes tentang pemeriksaan kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum sebagai pembanding.

7.2. Penentuan kadar kolesterol HDL serum⁽²⁶⁾

Kolesterol HDL ditentukan dengan pereaksi pengendapan selektif dengan menggunakan pereaksi heparin dan mangan klorida. Metode pengendapan selektif ini berdasarkan sifat lipoprotein yaitu kemampuannya untuk bereaksi dengan kation bervalensi dua (Mn^{2+}) dan polianion (heparin). Pada metode ini lipoprotein-lipoprotein yang terdapat dalam serum akan diendapkan, kecuali HDL, kemudian serum yang mengandung HDL ini ditentukan kadar kolesterol HDL-nya.

Pada penentuan kadar kolesterol HDL ini, serum yang digunakan adalah serum yang diambil dari hewan percobaan yang telah dipuaskan sebelumnya selama 12 - 24 jam. Pelaksanaan penentuan kadar kolesterol HDL serum adalah sebagai berikut :

Sebanyak 1 ml serum dimasukkan ke dalam tabung pemusing, kemudian ditambahkan berturut-turut larutan heparin 5000 unit/ml sebanyak 40 μ l, dengan mikro pipet, dan larutan mangan klorida 16,4 gram/dL sebanyak 50 μ l. Campuran dikocok sampai homogen dan didiamkan 30 menit pada suhu kamar. Setelah 30 menit, larutan dipusingkan selama 20 menit, kemudian supernatannya dipisahkan. Bila supernatan masih kelihatan keruh berarti pengendapan kurang sempurna, ditambah pengendap sampai pengendapan sempurna. Bila masih keruh, serum ini masih bisa ditentukan kadar kolesterol HDL serumnya, asalkan sebelum diambil darahnya hewan percobaan dipuaskan dulu selama 12 - 24 jam dan hewan percobaan

sehat. Supernatan dipipet 0,2 ml dengan mikro pipet dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml pereaksi warna Liebermann-Burchard, yang sebelumnya tabung direndam dulu dalam air es. Selanjutnya kadar kolesterol HDL ditentukan sama seperti pada penentuan kadar kolesterol total serum.

8. Analisis Data^(95,96,97)

Setelah didapatkan data hasil percobaan, dilakukan uji statistik yaitu uji anakova (analisis kovarian), dengan $\alpha = 0,05$.

	I		II		III		IV	
	x	y	x	y	x	y	x	y
	x_{11}	y_{11}	x_{12}	y_{12}	x_{13}	y_{13}	x_{14}	y_{14}
	x_{21}	y_{21}	x_{22}	y_{22}	x_{23}	y_{23}	x_{24}	y_{24}
	x_{31}	y_{31}	x_{32}	y_{32}	x_{33}	y_{33}	x_{34}	y_{34}
	x_{41}	y_{41}	x_{42}	y_{42}	x_{43}	y_{43}	x_{44}	y_{44}
	x_{51}	y_{51}	x_{52}	y_{52}	x_{53}	y_{53}	x_{54}	y_{54}
Total	Σx	Σy	Σx	Σy	Σx	Σy	Σx	Σy
Rerata	\bar{x}	\bar{y}	\bar{x}	\bar{y}	\bar{x}	\bar{y}	\bar{x}	\bar{y}

x = kadar kolesterol sebelum perlakuan

y = kadar kolesterol setelah perlakuan

i = kolom, 1, 2, ..., t

j = baris, 1, 2, ..., n

Tabel Anakova Pro CRD

Sumber Variasi	db	JK			Dikoreksi		
		Σ_{xx}	Σ_{xy}	Σ_{yy}	JKS	db	RJK
Antar Kelompok	t-1	T_{xx}	T_{xy}	T_{yy}
Dalam Kelompok	N-t	E_{xx}	E_{xy}	E_{yy}	S_E	N-t-1	$\frac{S_E}{db}$
Jumlah	N-1	S_{xx}	S_{xy}	S_{yy}	S_{T+E}	N-2	...
					$S_{T+E} - S_E$	t-1	$\frac{S_{T+E} - S_E}{t-1}$

$$F_{hitung} \text{ Anava} = \frac{(S_{T+E} - S_E)/(t-1)}{S_E/(N-t-1)}$$

$$db : v_1 = t - 1$$

$$v_2 = N - t - 1$$

$$F_{hitung} \text{ regresi} = \frac{E^2_{xy/E_{xx}}}{S_E/(N-t-1)}$$

$$db : v_1 = 1$$

$$v_2 = N - t - 1$$

Keterangan :

db = derajat bebas

JK = jumlah kuadrat

JKS = jumlah kuadrat sisa

RJK = rata-rata jumlah kuadrat

S_{xx} = koreksi jumlah total kuadrat dari x

$$= \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^t n_i}$$

S_{xy} = koreksi jumlah total hasil dari x dan y

$$= \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} y_{ij} - \frac{\left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right) \left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)}{\sum_{i=1}^l n_i}$$

S_{yy} = koreksi jumlah total kuadrat dari y

$$= \sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij}^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^l n_i}$$

T_{xx} = perlakuan jumlah kuadrat dari x

$$= \frac{\sum_{i=1}^l \left(\sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^l n_i}$$

T_{xy} = perlakuan jumlah hasil dari x dan y

$$= \frac{\sum_{i=1}^l \left(\sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right) \left(\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij} \right) \left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)}{\sum_{i=1}^l n_i}$$

T_{yy} = perlakuan jumlah kuadrat dari y

$$= \frac{\sum_{i=1}^l \left(\sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)^2}{n_i} - \frac{\left(\sum_{i=1}^l \sum_{j=1}^{n_i} y_{ij} \right)^2}{\sum_{i=1}^l n_i}$$

$$E_{xx} = S_{xx} - T_{xx}$$

$$E_{xy} = S_{xy} - T_{xy}$$

$$E_{yy} = S_{yy} - T_{yy}$$

$$S_E = E_{yy} - \frac{E_{xy}^2}{E_{xx}}$$

$$S_{T+E} = S_{yy} - \frac{S_{xy}^2}{S_{xx}}$$

Jika $F_{hitung} > F_{tabel}$ (ada perbedaan), untuk mengetahui apakah perbedaan yang terjadi itu bermakna atau tidak, dilakukan uji HSD (Honestly Significant Difference).

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{RJK}{n}}$$

Jika F_{hitung} beda mean $>$ HSD, berarti ada beda yang bermakna.

Jika beda mean $<$ HSD, berarti tidak ada beda yang bermakna.

BAB IV

HASIL PERCOBAAN

1. Analisis Kualitatif

1.1. Analisis kualitatif asam nikotinat

Tabel II Hasil analisis kualitatif asam nikotinat

	Hasil penganatan	Pustaka
- Organoleptis		
- warna	* serbuk putih	* serbuk atau kristal putih atau putih agak kelam
- rasa	* asam	* asam
- bau	* tidak berbau	* tidak berbau atau berbau lemah
- Dilarutkan dalam larutan natrium hidroksida 0,1 N, ditambah asam acetat encer dan tembaga sulfat	- terbentuk endapan biru perlahan-lahan	* terbentuk endapan biru perlahan-lahan ⁽¹⁵⁾
- Titik lebur	* 233° - 234°C	* 234° - 237°C ⁽¹⁶⁾

1.2. Analisis kualitatif kolesterol

Tabel III Hasil analisis kualitatif kolesterol

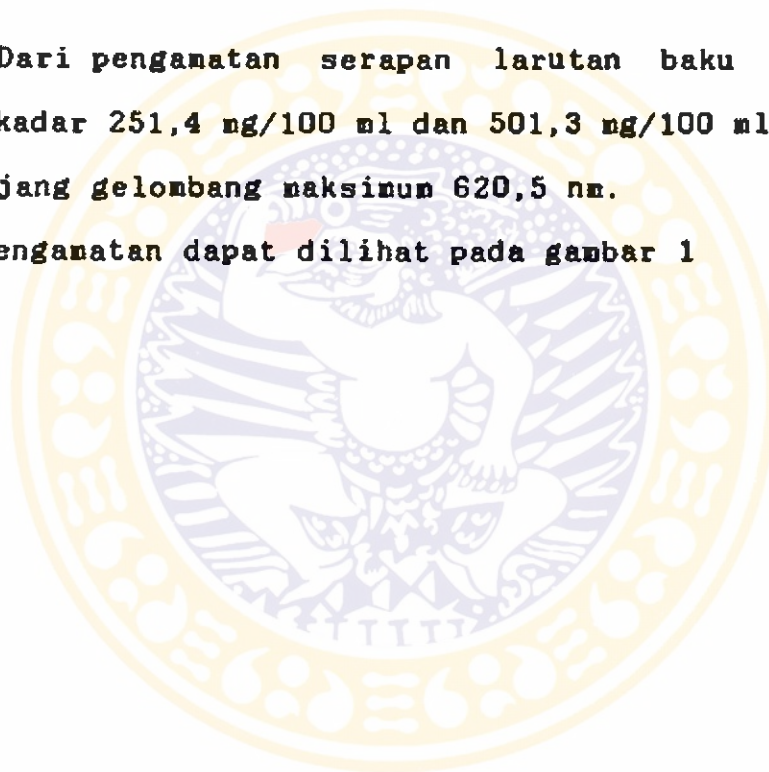
	Hasil penganatan	Pustaka
- Organoleptis		
- warna	* serbuk putih	* serbuk atau granul halus putih atau kekuningan
- bau	* tidak berbau	* tidak berbau ⁽¹⁶⁾

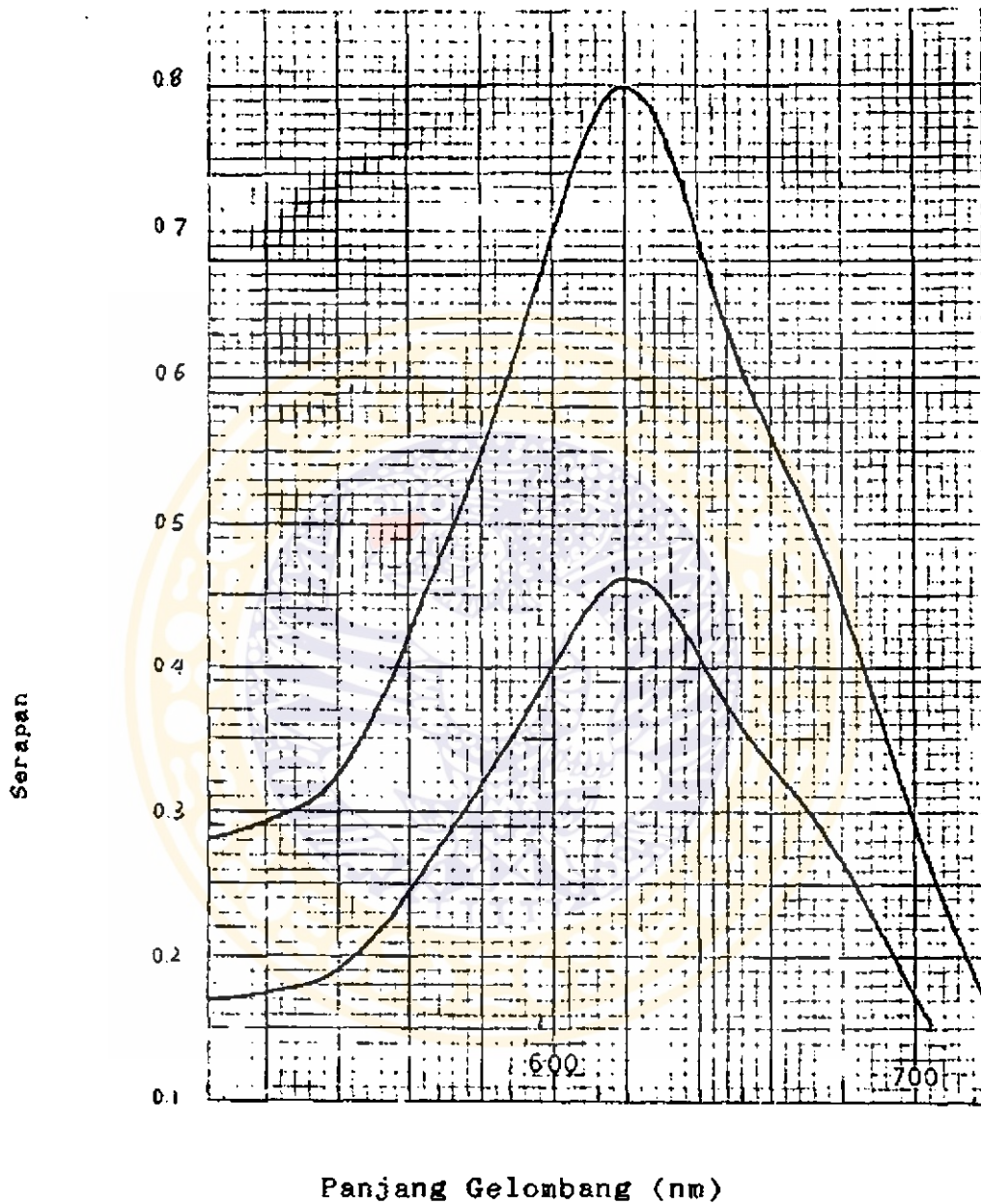
- Larutan dalam kloroform ditetesi asetat anhidrat & asam sulfat pekat	* terbentuk warna hijau kebiruan	* terbentuk warna hijau kebiruan
- Titik lebur	* 147° - 148°C	* 147° - 150°C ¹⁰

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dari penganatan serapan larutan baku kolesterol dengan kadar 251,4 ng/100 ml dan 501,3 ng/100 ml didapatkan panjang gelombang maksimum 620,5 nm.

Hasil penganatan dapat dilihat pada gambar 1





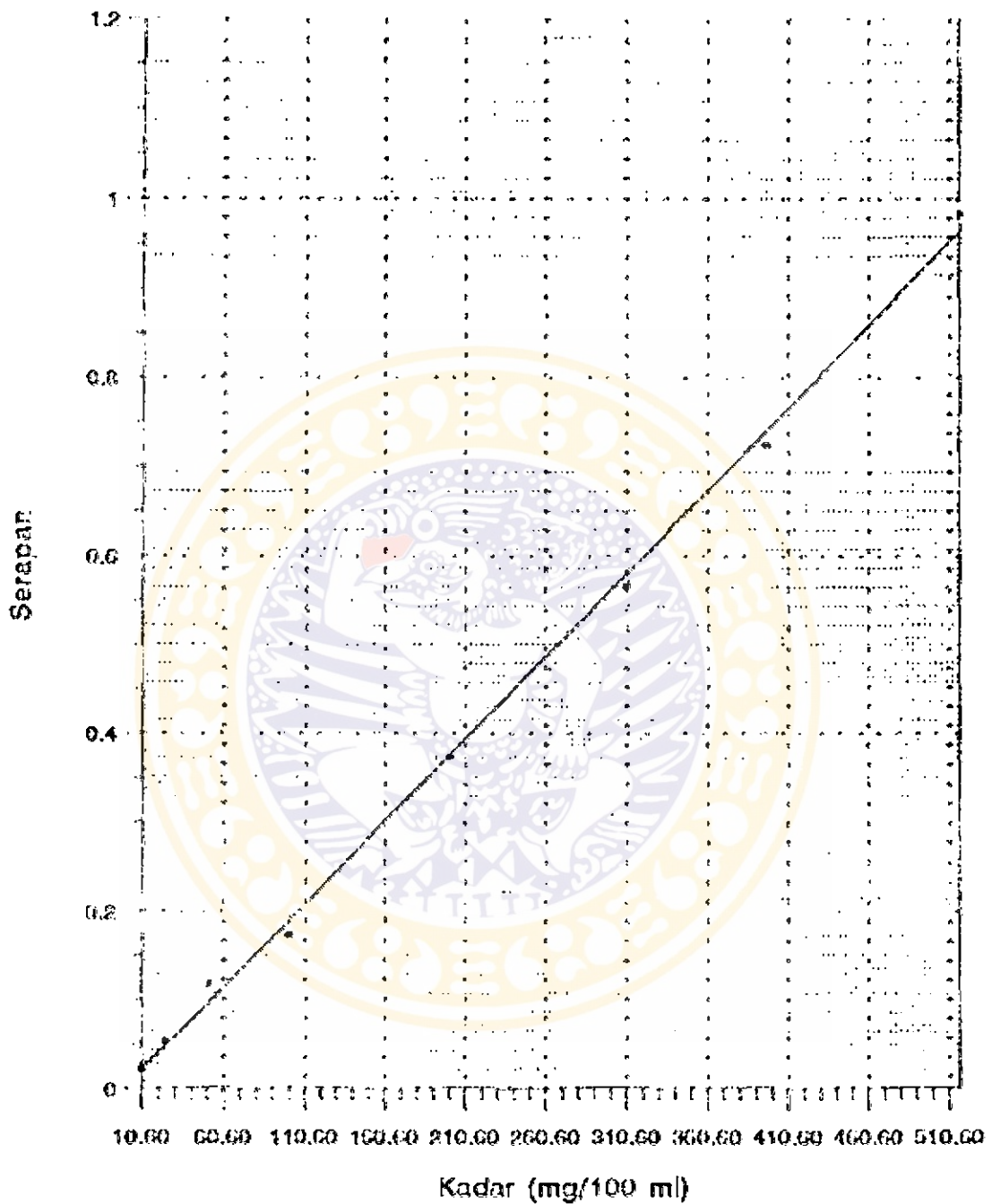
Gambar 1. Kurva serapan larutan baku kolesterol 251,4 mg/100 ml dan 501,3 mg/100 ml terhadap panjang gelombang.

3. Pembuatan Kurva Baku

Hasil pengamatan serapan larutan baku kolesterol dapat dilihat pada tabel IV kurva baku dapat dilihat pada gambar 2.

Tabel IV. Hasil pengamatan serapan larutan baku kolesterol

Kadar (mg/100 ml)	Serapan
10,60	0,022
25,16	0,054
51,70	0,118
100,80	0,173
200,80	0,373
310,20	0,567
396,80	0,725
517,00	0,985



Gambar 2. Kurva baku nilai serapan terhadap kadar larutan baku kolesteroi pada panjang gelombang maksimum (620,8 nm)

4. Uji validasi

4.1. Kelurusan

Kelurusan ditentukan untuk mengetahui adanya korelasi linier antara kadar zat yang dianalisis dengan serapan yang diberikan.

Hasil perhitungan untuk menyusun persamaan garis regresi dapat dilihat pada lampiran 1, persamaan garis regresi yang didapat adalah :

$$Y = 1,8601 \cdot 10^{-4} X + 0,0022$$

dengan harga koefisien korelasi = 0,9991. Dari tabel koefisien korelasi untuk derajat kebebasan (df) = 6 pada $\alpha = 0,05$ adalah 0,707. Harga r hitung lebih besar dari r tabel menunjukkan adanya korelasi linier antara kadar kolesterol dengan nilai serapannya.

4.2. Sensitifitas

Hasil pengamatan serapan blanko dapat dilihat pada tabel V, perhitungan harga LOD dan LOQ dapat dilihat pada lampiran 2.

Tabel V. Hasil pengamatan serapan blanko.

No.	Serapan
1.	0,019
2.	0,018
3.	0,017
4.	0,018
5.	0,016
6.	0,019
7.	0,017
8.	0,018
9.	0,018
10.	0,017

Dari hasil perhitungan didapat harga LOD adalah 0,34 ng/100 ml, dan harga LOQ adalah 3,91 ng/100 ml.

4.3. Presisi

Harga presisi didapatkan dengan mengamati serapan larutan baku kolesterol dengan kadar 200,8 ng/100 ml. Hasil pengamatan yang didapat tercantum pada tabel VI.

Tabel VI. Penentuan presisi

No.	Serapan	Kadar (ng/100 ml) = x
1.	0,379	202,57
2.	0,376	200,96
3.	0,385	205,80
4.	0,381	203,64
5.	0,381	203,64
6.	0,379	202,57
7.	0,381	203,84
8.	0,382	204,18
9.	0,379	202,57
10.	0,381	203,64

Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 S &= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \\
 &= \sqrt{\frac{14,5567}{10 - 1}} \\
 &= 1,2718
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \%KV &= \frac{S}{\bar{x}} \times 100\% \\
 &= \frac{1,2718}{203,32} \times 100\% \\
 &= 0,63\%
 \end{aligned}$$

4.4. Akurasi

Akurasi diperoleh berdasarkan perbandingan antara sampel terhitung dengan kadar sampel yang sebenarnya atau dinyatakan dengan prosen perolehan kembali (% Recovery) dengan persamaan.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{C_x - C_A}{C_B} \times 100\%$$

dimana :

C_x = Kadar terukur serum ditambah larutan baku

C_A = Kadar serum mula-mula

C_B = Kadar larutan baku yang ditambahkan

Hasil pengamatan dapat dilihat pada tabel VII.

Tabel VII. Penentuan akurasi

C_A	C_B	C_x	$C_x - C_A$	% Recovery
69,32	100,80	195,93	126,61	115,17
69,32	200,80	284,36	215,04	105,27
69,32	251,60	342,77	373,45	106,81
69,32	310,20	386,15	316,83	101,75

Rata-rata 110,88%

Dari hasil pengamatan didapatkan prosen recovery rata-rata 110,88%. Prosen recovery yang memenuhi syarat adalah 80 - 120%.⁽³⁾ Berarti metode yang digunakan memenuhi syarat.

5. Penentuan kadar kolesterol total serum.

Penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih dibagi menjadi 8 kelompok, yaitu :

Kelompok I : Makanan dasar (kontrol normal)

Kelompok II.1 : Makanan dasar + asam nikotinat dosis 1

Kelompok II.2 : Makanan dasar + asam nikotinat dosis 2

Kelompok II.3 : Makanan dasar + asam nikotinat dosis 3

Kelompok III : Makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml

Kelompok IV.1 : Makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 1

Kelompok IV.2 : Makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 2

Kelompok IV.3 : Makanan dasar + kolesterol 3% 1 ml +
asam nikotinat dosis 3

Hasil penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih dapat dilihat pada tabel VIII.

Tabel VIII. Hasil penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih.

I		II.1		II.2		II.3		III		IV.1		IV.2		IV.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
70,32	90,75	57,42	67,63	47,74	55,27	90,21	61,72	160,74	202,03	170,85	121,39	157,41	110,64	148,27	80,53
63,33	85,37	50,97	63,87	64,94	71,39	84,83	72,47	175,69	214,40	121,39	94,51	136,44	73,01	160,10	63,33
69,78	86,45	46,13	57,95	65,48	78,38	97,20	60,64	148,27	174,61	166,01	104,73	141,28	68,71	151,30	71,39
75,69	106,88	61,18	70,86	59,03	69,24	72,47	52,57	189,94	247,19	141,28	114,94	133,22	90,32	137,52	50,43
61,18	79,46	54,73	71,13	61,45	69,78	110,64	91,82	169,78	210,63	131,07	74,62	129,99	63,33	169,24	73,54

Keterangan :

X = Kadar kolesterol total serum tikus putih sebelum perlakuan (mg/100 ml)

Y = Kadar kolesterol total serum tikus putih setelah perlakuan (mg/100 ml)

Hasil pengamatan tersebut diolah secara statistik dengan uji analisis kovarians (Anakova) yang tertera pada lampiran 3, dengan $\alpha = 0,05$

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah ada perbedaan di antara kelompok I, II.1, II.2, II.3 dalam hal kolesterol total^(95,96,97)

Dari hasil perhitungan dengan Anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 25,70 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{\text{tabel}}(\alpha=0,05) = 3,29$$

$$F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}} \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$25,70 > 3,29$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti ada perbedaan kadar kolesterol total di antara kelompok-kelompok tersebut. Untuk mengetahui apakah perbedaan tersebut bermakna atau tidak maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD dapat dilihat pada tabel IX.

$$\begin{aligned} \text{HSD} &= q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\text{RJK}}{n}} \\ &= 4,05 \sqrt{\frac{35,70}{5}} \\ &= 10,02 \end{aligned}$$

Tabel IX. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol serum tikus putih

	X_I	$X_{II.1}$	$X_{II.2}$	$X_{II.3}$
X_I	-	23,48	20,87	21,94
$X_{II.1}$	-	-	2,52	1,55
$X_{II.2}$	-	-	-	0,97
$X_{II.3}$	-	-	-	-

Keterangan :

X = Kadar kolesterol HDL rata-rata setelah perlakuan (mg/100 ml)

$q_{\alpha, k, N-k}$ = Harga tabel pada $\alpha = 0,05$, dengan derajat bebas k dan $N-k$

RJK = Rata-rata jumlah kuadrat (dalam perlakuan)

Harga HSD yang didapat 10,02 ; hal ini berarti :

- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok II.1, II.2, II.3, bila dibandingkan dengan kelompok I (Kontrol)
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok II.2, II.3 bila dibandingkan dengan kelompok II.1.
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok II.3 bila dibandingkan dengan kelompok II.2.

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah efek yang terjadi setelah perlakuan dipengaruhi oleh kadar kolesterol total sebelum perlakuan. ^(35,36,37)

Dari hasil perhitungan dengan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 34,20 \quad ; \quad \text{derajat bebas } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 4,54$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$34,20 > 4,54$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti ada pengaruh kadar kolesterol total sebelum perlakuan dengan efek yang ditimbulkan setelah perlakuan.

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah ada perbedaan di antara kelompok III, IV.1, IV.2, IV.3, dalam hal kolesterol total. ^(35,36,37)

Dari hasil perhitungan Anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 63,89 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 3,29$$

$$F_{hitung} > F_{tabel} \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$63,89 > 3,29$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti ada perbedaan kadar kolesterol total di antara kelompok-kelompok tersebut.

Untuk mengetahui apakah perbedaan tersebut bermakna atau tidak maka dilakukan uji HSD. Hasil uji HSD dapat dilihat pada tabel X

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{RJK}{n}}$$

$$= 4,05 \sqrt{\frac{186,41}{5}}$$

$$= 24,73$$

Tabel X. Hasil uji penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih

	X_{III}	$X_{IV.1}$	$X_{IV.2}$	$X_{IV.3}$
X_{III}	-	107,73	128,57	141,93
$X_{IV.1}$	-	-	20,84	34,20
$X_{IV.2}$	-	-	-	13,36
$X_{IV.3}$	-	-	-	-

Keterangan :

X = Kadar kolesterol HDL rata-rata setelah perlakuan (mg/100 ml)

$q_{\alpha, k, N-k}$ = Harga tabel pada $\alpha = 0,05$, dengan derajat bebas k dan $N-k$

RJK = Rata-rata jumlah kuadrat (dalam perlakuan)

Harga HSD yang didapat 24,73 ; hal ini berarti :

- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok IV.1 IV.2, IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok III.
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok IV.2 bila dibandingkan dengan kelompok IV.1
- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok IV.1
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok IV.2

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah efek yang terjadi setelah perlakuan dipengaruhi oleh kadar kolesterol total sebelum perlakuan ^(95,96,97)

Dari hasil perhitungan dengan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 17,71 ; \text{derajat bebas } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 4,54$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$17,71 > 4,54$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti ada pengaruh kadar kolesterol total sebelum perlakuan dengan efek yang ditimbulkan setelah perlakuan.

6. Penentuan Kolesterol HDL Serum

Penentuan kadar kolesterol HDL serum Tikus putih dibagi menjadi 8 kelompok seperti pada nomor 5. Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih dapat dilihat pada tabel XI.

Tabel XI. Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih.

I		II.1		II.2		II.3		III		IV.1		IV.2		IV.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
57,95	49,94	54,11	60,25	68,48	70,82	58,29	73,43	47,42	45,05	46,19	62,35	57,31	74,73	51,78	82,65
49,06	53,09	64,14	70,96	60,27	69,88	67,69	72,55	50,732	52,10	71,88	84,08	60,60	80,01	56,35	80,96
57,62	58,96	62,69	67,54	55,67	65,03	62,39	67,20	64,83	63,98	52,08	78,95	64,43	83,57	61,68	84,94
48,16	53,72	50,78	55,24	55,38	58,07	70,33	84,67	50,89	53,89	63,85	69,13	57,22	87,98	57,78	80,81
53,43	51,28	56,77	57,29	59,32	71,30	50,92	63,70	55,98	56,35	57,75	77,28	72,27	88,96	55,52	78,08

Keterangan :

X = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih sebelum perlakuan

Y = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih setelah perlakuan

Hasil penganatan tersebut diolah secara statistik dengan uji analisis kovarians (Anakova) yang tertera pada lampiran 4, dengan $\alpha = 0,05$

- 1) Uji Anakova untuk mengetahui apakah ada perbedaan di antara kelompok I, II.1, II.2, II.3, dalam hal kolesterol HDL^(35,36,37)

Dari hasil perhitungan dengan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 7,19 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 3,29$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$7,19 > 3,29$$

Maka H_a diterima dan H_o ditolak, hal ini berarti bahwa ada perbedaan efek diantara kelompok-kelompok tersebut dalam hal kadar kolesterol HDL.

Untuk mengetahui apakah perbedaan itu bermakna atau tidak dilakukan uji HSD, hasil dari uji HSD ini dapat dilihat pada tabel XII

$$\begin{aligned} \text{HSD} &= q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\text{RJK}}{n}} \\ &= 4,05 \sqrt{\frac{17,47}{5}} \\ &= 7,54 \end{aligned}$$

Tabel XII. Hasil uji HSD penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih

	X_I	$X_{II.1}$	$X_{II.2}$	$X_{II.3}$
X_I	-	8,86	13,66	18,91
$X_{II.1}$	-	-	4,80	10,05
$X_{II.2}$	-	-	-	5,25
$X_{II.3}$	-	-	-	-

Keterangan :

X = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kolesterol total rata-rata setelah perlakuan

$q_{\alpha, k, N-k}$ = Harga tabel pada $\alpha = 0,05$, dengan derajat bebas k dan $N-k$

RJK = Rata-rata jumlah kuadrat (dalam perlakuan)

Harga HSD yang didapat 7,54 ; hal ini berarti :

- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok II.1, II.2 dan II.3 bila dibandingkan dengan kelompok I
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok II.2 bila dibandingkan dengan kelompok II.1.
- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok II.3, bila di bandingkan dengan kelompok II.1.
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok II.3 bila dibandingkan kelompok II.2.

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah efek yang terjadi setelah perlakuan dipengaruhi oleh kadar kolesterol HDL sebelum perlakuan ^(95,96,97)

Dari hasil perhitungan dengan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 18,23 ; \text{derajat } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 4,54$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$18,23 > 4,54$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti ada pengaruh kadar kolesterol HDL sebelum perlakuan dengan efek yang ditimbulkan setelah perlakuan.

- Uji anakova untuk mengetahui apakah ada perbedaan di antara kelompok III, IV. 1, IV. 2, IV. 3, dalam hal kolesterol HDL^(35,36,37)

Dari perhitungan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 26,88 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 3,29$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ Pada } \alpha = 0,05$$

$$26,88 > 3,29$$

Maka H_a diterima dan H_0 ditolak, hal ini berarti bahwa ada perbedaan kadar kolesterol HDL di antara kelompok-kelompok tersebut.

Untuk mengetahui apakah perbedaan itu bermakna atau tidak dilakukan uji HSD, hasil dari uji HSD ini dapat dilihat pada tabel XIII.

$$\begin{aligned}
 \text{HSD} &= q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{\text{RJK}}{n}} \\
 &= 4,05 \sqrt{\frac{22,84}{5}} \\
 &= 8,66
 \end{aligned}$$

Tabel XIII. Hasil uji penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih

	X_{III}	$X_{IV.1}$	$X_{IV.2}$	$X_{IV.3}$
X_{III}	-	20,09	28,78	27,22
$X_{IV.1}$	-	-	8,69	7,13
$X_{IV.2}$	-	-	-	1,56
$X_{IV.3}$	-	-	-	-

Keterangan :

- X = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total rata-rata setelah perlakuan
- $q_{\alpha, k, N-k}$ = Harga tabel pada $\alpha = 0,05$, dengan derajat bebas k dan $N-k$
- RJK = Rata-rata jumlah kuadrat (dalam perlakuan)

Harga HSD yang didapat 8,66; hal ini berarti :

- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok IV.1, IV.2, IV. 3 bila dibandingkan dengan kelompok III.
- Terdapat perbedaan bermakna antara kelompok IV.2 bila dibandingkan dengan kelompok IV.1
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok IV. 1
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kelompok IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok IV.2

- Uji Anakova untuk mengetahui apakah efek yang terjadi setelah perlakuan dipengaruhi oleh kadar HDL sebelum perlakuan^(95,96,97)

Dari hasil perhitungan dengan anakova didapatkan :

$$F_{hitung} = 13,36 ; \text{derajat bebas } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{tabel}(\alpha=0,05) = 4,54$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}, \text{ pada } \alpha = 0,05$$

$$13,36 > 4,54$$

Maka H_a diterima dan H_o ditolak, hal ini berarti ada pengaruh kadar kolesterol HDL sebelum perlakuan dengan efek yang ditimbulkan setelah perlakuan.

7. Penentuan Pola Kadar Kolesterol Total Serum

Dari hasil penentuan kadar kolesterol total serum tikus putih sebelum dan setelah perlakuan, maka dapat ditentukan pola kadar kolesterol total serum tikus putih pada pemberian asam nikotinat.

Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel XIV. Pola kadar kolesterol total dapat dilihat pada gambar 3.

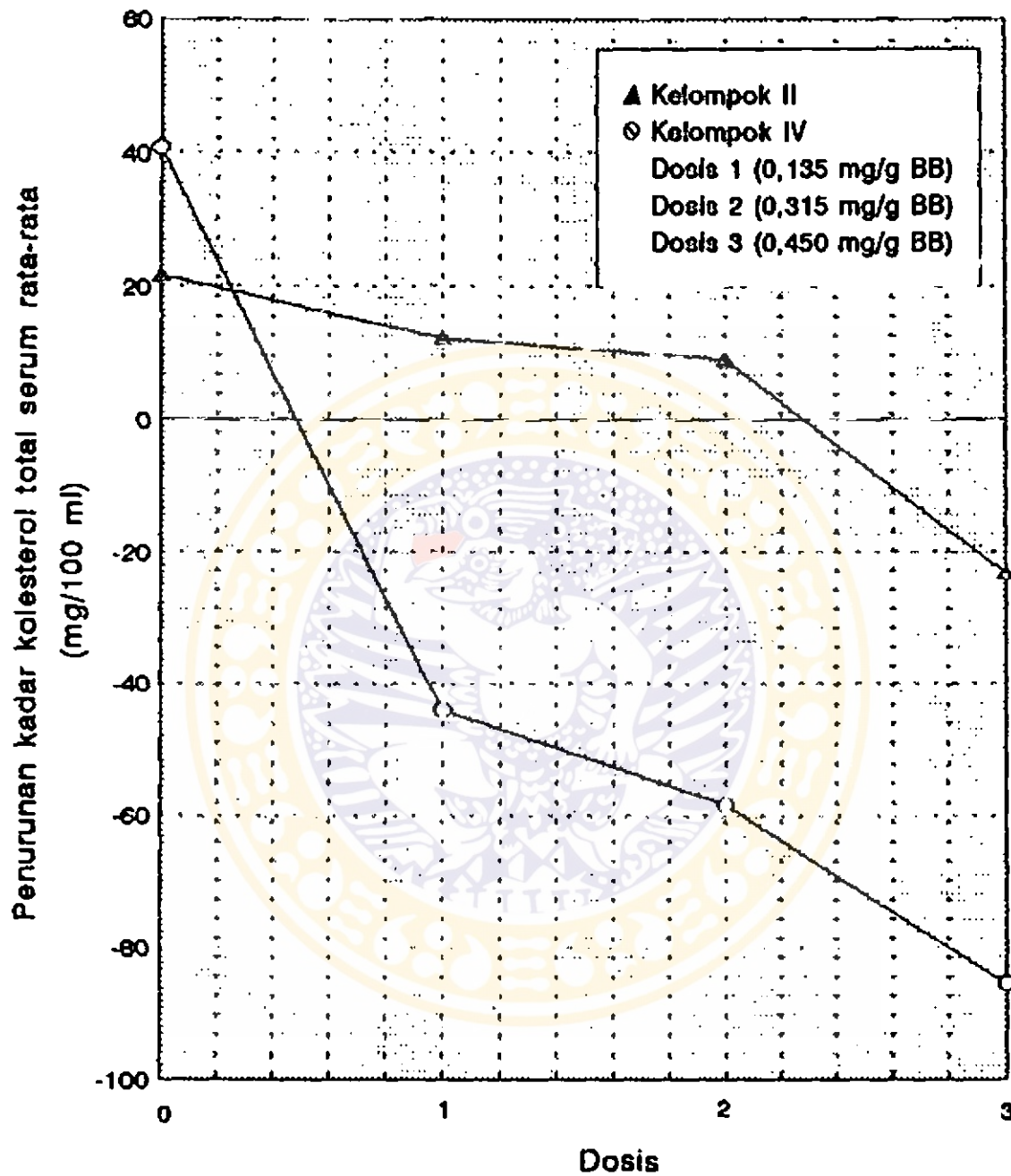
Tabel XIV. Kadar kolesterol total serum rata-rata.

Kelompok	x	y	(y - x)
I. (kontrol normal)	68,06	89,78	21,72
II.1 (kontrol perlakuan)	54,09	66,29	12,20
II.2 (kontrol perlakuan)	59,73	68,81	9,08
II.3 (kontrol perlakuan)	91,07	67,84	-23,23
III. (hiperkolesterolemia)	168,88	209,77	40,89
IV.1 (perlakuan)	146,12	102,04	-44,08
IV.2 (perlakuan)	139,67	81,20	-58,47
IV.3 (perlakuan)	153,33	67,84	-85,49

Keterangan :

x = Kadar kolesterol total serum rata-rata sebelum perlakuan (mg/100 ml)

y = Kadar kolesterol total serum rata-rata setelah perlakuan (mg/100 ml)



Gambar 3. Pola kadar kolesterol total serum tikus putih pada pemberian asam nikotinat.

8. Penentuan Pola Kadar Kolesterol HDL Serum

Pola kadar kolesterol HDL serum ditentukan dari prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total.

Hasil perhitungan dapat dilihat pada tabel XV dan gambar 4.

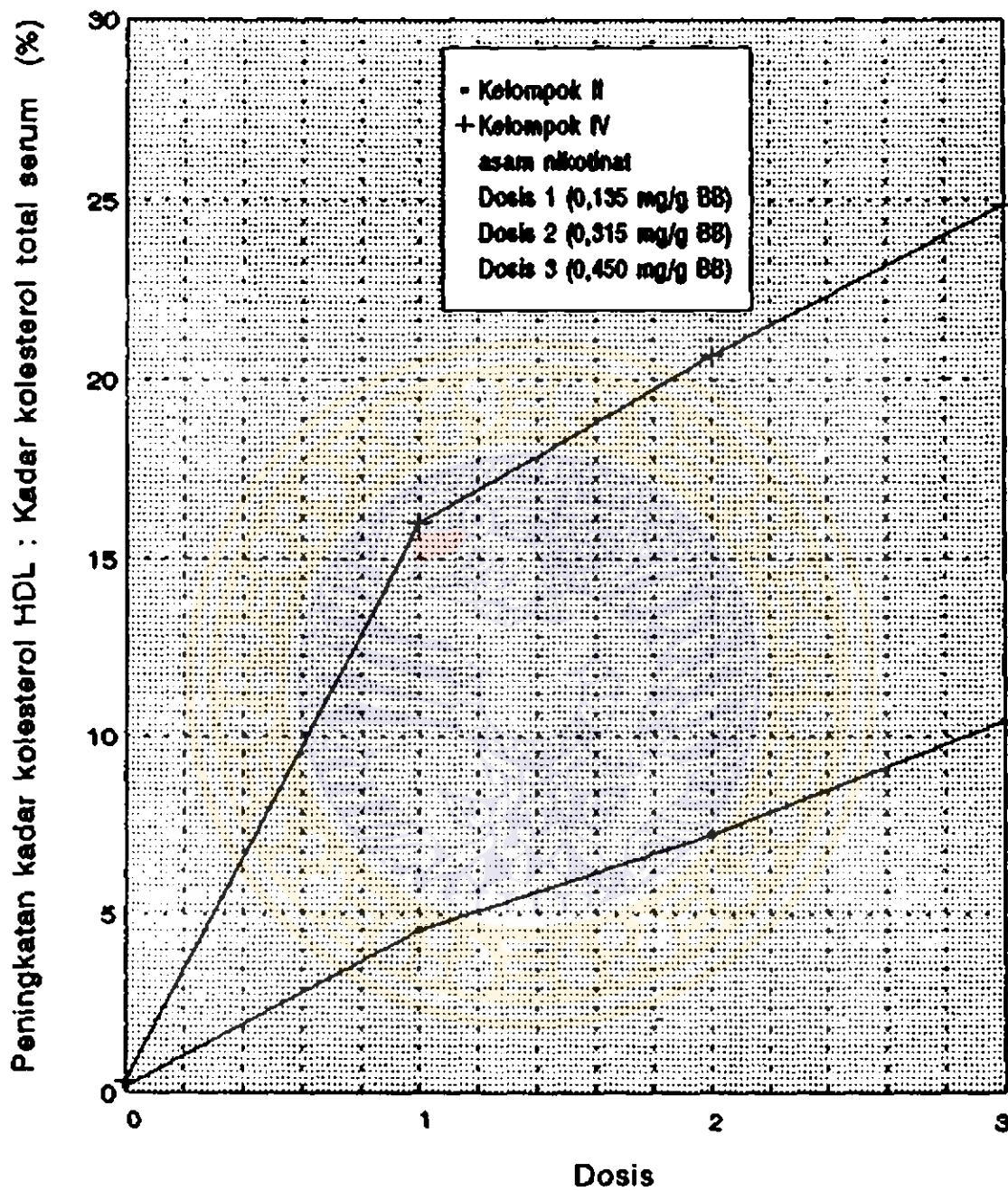
Tabel XV. Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total.

Kelompok	x	y	(y - x)
I. (kontrol normal)	53,24	53,40	0,16
II.1 (kontrol perlakuan)	57,70	62,26	4,56
II.2 (kontrol perlakuan)	59,82	67,06	7,24
II.3 (kontrol perlakuan)	61,92	72,31	10,39
III. (hiperkolesterolemia)	53,97	54,27	0,30
IV.1 (perlakuan)	58,35	74,36	16,01
IV.2 (perlakuan)	62,37	83,05	20,68
IV.3 (perlakuan)	56,62	81,49	24,87

Keterangan :

x = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total sebelum perlakuan.

y = Prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total setelah perlakuan.



Gambar 4. Pola kadar kolesterol HDL pada pemberian asam nikotinat.

BAB V

PEMBAHASAN

Hasil analisis kualitatif asam nikotinat dan kolesterol seperti organoleptis, reaksi warna, reaksi pengendapan dan penentuan titik lebur sesuai dengan pustaka. Hal ini berarti bahwa bahan penelitian benar dan bisa digunakan untuk penelitian.

Pada penelitian ini, pengamatan dilakukan pada panjang gelombang maksimum 620,5 nm. Menurut pustaka, penentuan kadar kolesterol dengan menggunakan pereaksi Liebermann-Burchard dilakukan pada panjang gelombang maksimum sekitar 620 nm.⁽²⁵⁾ Adanya pergeseran panjang gelombang maksimum ini kemungkinan dipengaruhi oleh kecepatan pembentukan senyawa kolestapoliena. Hal ini berdasarkan sifat kolesterol yang dapat bereaksi dengan asam kuat membentuk senyawa kolestapoliena yang berwarna hijau-biru, yang dapat diukur secara spektrofotometri.

Kurva baku dibuat dari larutan baku kerja kolesterol dengan kadar 100,0 ppm; 250,0 ppm; 500,0 ppm; 1000,0 ppm; 2000,0 ppm; 3000,0 ppm; 4000,0 ppm dan 5000,0 ppm. Hal ini berdasarkan atas kadar kolesterol darah pada tikus normal adalah 100,0 ppm sampai 540,0 ppm. Karena tikus dibuat dalam keadaan hiperkolesterolemia yaitu dengan pemberian suspensi kolesterol 3% 1 ml, maka pembuatan kurva baku sampai kadar 5000,0 ppm.

Pada penelitian ini, dilakukan pengukuran kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum dengan menggunakan pereaksi Lieberman-Burchard menurut metode Huang dan kawan-kawan. Metode ini mempunyai banyak keuntungan di bandingkan dengan metode lain yaitu :⁽²⁰⁾

- prosedur pelaksanaannya relatif murah
- hanya menggunakan satu reaksi warna dan pemeriksaan secara langsung
- pereaksi yang digunakan stabil selama dua minggu pada suhu kamar dan empat minggu di dalam almari es.
- reaksi warna maksimum sudah terbentuk selama 20 menit dan warna yang terjadi tetap stabil selama 20 menit
- faktor suhu tidak begitu mempengaruhi reaksi warna.

Pada penentuan kadar kolesterol HDL serum digunakan metode pengendapan selektif yang pada dasarnya terdiri dari dua tahapan yaitu tahap pengendapan dan tahap penentuan kadar kolesterol HDL. Oleh karena itu metode ini tergantung pada kesempurnaan pengendapan lipoprotein-lipoprotein selain HDL.

Pada penelitian ini digunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain wistar, berjenis kelamin jantan, dengan alasan sebagai berikut :⁽²⁴⁾

- biaya relatif murah
- peneliharaan relatif mudah
- mempertimbangkan volume darah yang diambil.

- mempunyai anatomi dan fungsi lambung yang mirip dengan manusia.

Kolesterol diberikan selama 1 minggu sebelum perlakuan dalam bentuk suspensi dengan zat pensuspensi CMC Na 1%. Pemberian asam nikotinat dilakukan setiap hari selama 4 minggu. Pada awal dan akhir penelitian diambil sampel darah untuk ditentukan kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum.

Setelah dilakukan penelitian kadar kolesterol total dan di uji dengan anakova (pada $\alpha = 0,05$) ternyata pada pemberian asam nikotinat baik dalam keadaan normal maupun hiperkolesterolemia menunjukkan adanya perbedaan efek di antara kelompok dan kadar kolesterol total serum setelah perlakuan dipengaruhi oleh kadar kolesterol total serum sebelum perlakuan.

Untuk mengetahui apakah perbedaan efek yang terjadi di antara kelompok bermakna atau tidak, maka setelah di uji dengan anakova dilanjutkan dengan uji HSD (Honestly Significant Difference).

Dari hasil uji HSD didapatkan hasil sebagai berikut :
(pada $\alpha = 0,05$)

- Ada perbedaan bermakna dari kadar kolesterol total serum tikus putih yang diberi asam nikotinat dosis 1, dosis 2 dan dosis 3 (kelompok II.1, II.2,

II.3) bila dibandingkan dengan kelompok I (kontrol normal).

Hal ini berarti bahwa asam nikotinat dapat mempengaruhi kadar kolesterol total serum tikus putih pada keadaan normal.

Dari data terlihat bahwa pada kelompok II.1 dan II.2 mengalami peningkatan kadar kolesterol total serum, tetapi peningkatannya lebih rendah bila dibandingkan dengan kontrol normal. Sedangkan pada kelompok II. 3 mengalami penurunan kadar kolesterol total serum.

- Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar kolesterol total serum kelompok II.2 dan II.3 bila dibandingkan dengan kelompok II.1.

Hal ini berarti bahwa penurunan kadar kolesterol total serum pada kelompok normal yang diberi asam nikotinat dosis 2 dan dosis 3 tidak memberikan makna yang berbeda dengan penurunan kadar kolesterol total serum pada kelompok normal yang diberi asam nikotinat dosis 1.

- Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar kolesterol total serum kelompok II. 3 bila dibandingkan dengan kelompok II. 2.

Hal ini berarti bahwa penurunan kadar kolesterol total serum pada kelompok normal yang diberi asam nikotinat dosis 3 tidak memberikan makna yang berbeda bila dibandingkan dengan penurunan kadar

kolesterol total serum pada kelompok normal yang diberi asam nikotinat dosis 2

- Ada perbedaan bermakna dari kadar kolesterol total serum tikus putih kelompok IV.1, IV.2 dan IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok III (kontrol hiperkolesterolemia)

Hal ini berarti bahwa asam nikotinat dapat mempengaruhi kadar kolesterol total serum pada keadaan hiperkolesterolemia. Dari data terlihat bahwa pada kelompok hiperkolesterolemia yang diberi asam nikotinat dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 (kelompok IV.1, IV.2, IV.3) mengalami penurunan kadar kolesterol total serum

- Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar kolesterol total serum tikus putih kelompok IV.2 bila dibandingkan dengan kelompok IV.1. Hal ini berarti penurunan kadar kolesterol total serum pada kelompok IV.2 tidak berbeda dengan kelompok IV.1
- Tidak ada perbedaan bermakna antara kadar kolesterol total serum tikus putih kelompok IV.3 bila dibandingkan dengan kelompok IV.2. Penurunan kadar kolesterol total serum kelompok IV.3 lebih besar dibandingkan kelompok IV.2, tetapi perbedaan ini tidak bermakna.

Pada pemberian asam nikotinat, penurunan kadar kolesterol baik pada keadaan normal maupun hiperkoles-

terolemia kemungkinan di sebabkan karena terjadi hambatan pada siklus Adenosin Monophosphate (AMP) sehingga terjadi akumulasi AMP di jaringan adiposa, yang dapat menurunkan aktivitas dari enzim triglicerida lipase.

Hal ini akan menurunkan pelepasan asam lemak bebas oleh jaringan adiposa dan menyebabkan penurunan pembentukan kolesterol VLDL dan LDL.⁽⁶⁾ Di samping itu penurunan kadar kolesterol juga disebabkan oleh adanya hambatan penyerapan kolesterol dari saluran cerna, sehingga kolesterol yang diberikan dari luar dengan cepat dapat diturunkan kadarnya.⁽¹⁹⁾

Dari hasil uji Anakova terlihat bahwa variasi individu sangat mempengaruhi kadar kolesterol total serum tikus putih. Kemungkinan ada individu yang cepat mengekskresi kolesterol, dan ada juga individu yang ekskresi kolesterolnya lambat.

Hasil penentuan kadar kolesterol HDL serum tikus putih setelah pemberian asam nikotinat baik pada keadaan normal maupun hiperkolesterolemia menunjukkan adanya efek yang berbeda antara kelompok, setelah diuji dengan anakova (pada $\alpha = 0,05$).

Kadar kolesterol HDL serum setelah perlakuan di pengaruhi oleh kadar kolesterol HDL serum sebelum perlakuan. Setelah dilakukan uji HSD hasilnya sebagai berikut :

- Ada perbedaan bermakna dari kadar kolesterol HDL serum tikus putih kelompok II.1, II.2 dan II.3 bila

dibandingkan dengan kelompok I (kontrol normal). Pemberian asam nikotinat meningkatkan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum.

- Ada perbedaan bermakna dari kadar kolesterol HDL serum tikus putih pada kelompok IV.1, IV.2, IV.3 bila dibandingkan kelompok III (kontrol hiperkolesterolemia).

Hal ini berarti bahwa asam nikotinat dapat mempengaruhi kadar kolesterol HDL serum pada keadaan hiperkolesterolemia.

Dari data terlihat terjadi peningkatan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum.

Pada pemberian asam nikotinat ini, terjadi peningkatan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL serum dengan kadar kolesterol total serum baik pada keadaan normal maupun keadaan hiperkolesterolemia.

Hal ini kemungkinan disebabkan karena asam nikotinat menghambat kecepatan katabolisme HDL, sehingga kadar kolesterol HDL di dalam plasma meningkat.⁽¹⁴⁾

Pada percobaan ini dosis asam nikotinat yang diberikan adalah 0,135 mg/g BB, 0,315 mg/g BB dan 0,450 mg/g BB. Hal ini didasarkan pada dosis yang digunakan pada penderita hiperkolesterolemia yaitu 1,5 - 3,5 g/hari.⁽⁷⁾

Untuk melihat pengaruh peningkatan dosis dipakai dosis 5 g/hari, kemudian diterapkan pada hewan coba berdasarkan nilai konversi.⁽²⁹⁾

Pada keadaan hiperkolesterolemia, pemberian dosis 0,135 mg/g BB terjadi penurunan kadar kolesterol total dan peningkatan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum. Hal ini meningkat pada pemberian dosis 0,135 mg/g BB dan 0,450 mg/g BB.

Pada keadaan normal, pemberian dosis 0,135 mg/g BB dan 0,315 mg/g BB meningkatkan kadar kolesterol total serum tetapi peningkatannya lebih rendah dari kelompok kontrol. Pemberian dosis 0,450 mg/g BB menurunkan kadar kolesterol total serum.

Penurunan kadar kolesterol total pada keadaan normal lebih rendah dibandingkan keadaan hiperkolesterolemia, hal ini berarti tubuh memerlukan kolesterol untuk fungsi keseimbangan. Penggunaan kolesterol yang terbanyak dalam tubuh adalah untuk membentuk asam kolat di hati. Sebanyak 80% kolesterol diubah menjadi asam kolat, yang mempermudah pencernaan dan absorpsi lemak. Sejumlah kecil kolesterol digunakan oleh kelenjar adrenal untuk membentuk hormon korteks adrenal; oleh ovarium untuk membentuk progesteron dan estrogen dan oleh testis untuk membentuk testosteron. Di samping itu kolesterol juga berfungsi untuk mengatur efek permeabilitas membran.⁽⁴⁹⁾

Asam nikotinat dalam mempengaruhi pola kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum tikus putih sangat dipengaruhi oleh variasi individu dan dosis pemberian.

Pola kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum tikus putih dalam keadaan normal berbeda dengan keadaan hiper-kolesterolemia.



BAB VI

KESIMPULAN

Dari data yang di peroleh dapat di simpulkan bahwa :

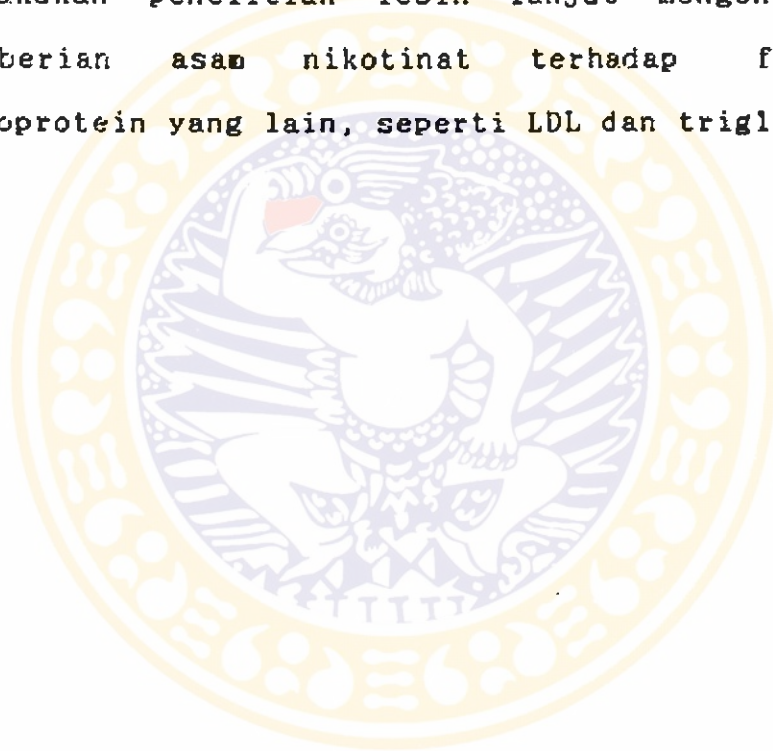
1. Pemberian asam nikotinat dosis 0,135 mg/g BB, dosis 0,315 mg/g BB dan dosis 0,450 mg/g BB, dapat menurunkan kadar kolesterol total serum tikus putih baik dalam keadaan normal maupun keadaan hiperkolesterolemia (pada derajat kepercayaan 0,05).
2. Pemberian asam nikotinat dosis 0,135 mg/g BB, dosis 0,315 mg/g BB dan dosis 0,450 mg/g BB, dapat meningkatkan prosentase perbandingan kadar kolesterol HDL dengan kadar kolesterol total serum tikus putih baik pada keadaan normal maupun keadaan hiperkolesterolemia (pada derajat kepercayaan 0,05).

BAB VII

SARAN

Dari hasil yang diperoleh dapat disarankan :

- Untuk memberikan gambaran yang lebih jelas tentang pengaruh pemberian asam nikotinat terhadap kadar kolesterol total dan kolesterol HDL serum dalam kaitannya dengan penyakit arterosklerosis, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian asam nikotinat terhadap fraksi-fraksi lipoprotein yang lain, seperti LDL dan trigliserida.



DAFTAR PUSTAKA

1. Saleh, M 1981, Masalah Penyakit Jantung dan Pembuluh Darah di Indonesia Dewasa ini dan di Masa Mendatang, Pidato pengukuhan jabatan Guru Besar Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Surabaya, hal. 21-25.
2. Suyono, S., dkk, 1988, Pengalanan Pengobatan Hiperlipidemia Primer dengan Gemfibrozil di FKUI/RS. Dr. Ciptomangun Kusuma Jakarta, Medika, No. 10, Tahun 15, hal. 876-878.
3. Grundy, S.M., 1978, Cholesterol Metabolism in Man, The Western Journal of Medicine, Vol. 128, p. 12-25.
4. Anonim, 1990, Lypoprotein As Risk Fakhors in Coronary Heart Disease, Symposium Reporter, Medical Progress, p. 13-17.
5. Scheig, R., Antihyperlipidemie Agents, In : Smith, C.M., and A.M. Reynard, 1992, Textbook of Pharmacology, W.B. Saunder Company, Philadelphia, p. 633-639.
6. Atmana, 1991, Pengaruh Diet Kedelai dan Kelapa Terhadap Kadar Total Kolesterol, Kolesterol LDL dan HDL dalam Serum Marmut, Medika, No. 11, Tahun 17, hal. 876-879.
7. Malloy, M.J. and J.P. Kane, Agents used in Hyperlipidemia, In : Katzung, B.G., 1984, Basic and Clinical Pharmacology, Second Edition, Lange Medical Publication, Los Altos, California, p. 388-399.
8. Mann, J.L., 1991, Diet and Cholesterol, Focus on Cholesterol II, Medical Progress, December, p. 21-23.
8. Gaman, P.M., Sherrington, K.B., Ilmu Pangan, Pengantar Ilmu Pangan, Nutrisi dan Mikrobiologi, Terjemahan Murdijati Gardjito, edisi kedua, Gajah Mada University Press, Yogyakarta, hal. 118-120.
10. Dood, J.M., Zimetbaum, P.J., Frishman, W.H., 1991, Nicotinic Acid for The Treatment of Hyperlipoproteinemia, Journal Clinical Pharmacology, Vol. 31, No. 7, p. 641-650.

11. Illingworth, 1987, Lipia Lowering drugr, An Overview of Indications and Optimum Therapeutic use, Drugs, Vol. 33, No. 3, p. 259-279.
12. Angelin, B., Eriksson M., Einarsson, K., 1986, Combined Treatment With Cholestyramine and Nicotinic Acid in Heterozygous Familial Hyper cholesterolaemia, Effects on Biliary Lipid Compositon, Journal Clinical Invest, Vol. 16, No. 5, p. 391-396.
13. Morishita, S., et al, 1986, Stains and Species Differences in Experimental Hyperlipidemia, Nippon-Yakurigaku, Zasshi, Vol. 87, No. 3, p. 259-264.
14. Martin, D.W., Mayes, P.A., and Rodwell, V.W., 1981, Harper's Review of Biochemistry, Eightteenth Edition, Lange Medical Publications, Los Altos, California, p. 193-194, 227-231, 237-242, 575.
15. Wohl, M.G., Goodheart, R.S., 1964, Modern Nutrition in Health and Disease, Third Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, p. 389-392.
16. Reynolds, J.E.F., 1989, Martindale the Extra Pharmacopoeia, Twenty ninth Edition, The Pharmaceutical Press, London, p. 1648-1650.
17. Sitepoe Mangku, 1992, Kolesterolfobia, Keterkaitannya dengan Penyakit Jantung, P.T. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, hal. 73-79.
18. Harrow, B. and Mazur, A., 1962, Textbook of Biochemistry, Eight Edition, W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 43-45, 54-58, 65-67, 315-317.
19. Guyton, A.C., 1976, Terjemahan Adji Dharma, Buku Teks Fisiologi Kedokteran, EGC Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, p. 372-383.
20. Witstun, J., Schonfeld, G., 1979, High Density Lipoprotein, Diabetes 28, April, p. 326-336.
21. Luke, B., 1984, Principles of Nutrition and Diet Therapy, First Edition, Little Brown and Company, Boston, p. 681-681.
22. Inglis, J.K., 1980, Introduction Laboratory Animal Science Technology, First Edition, Pergamon Press, Oxford, p. 256-258.
23. Ghosh, M.N., 1971, Fundamentals of Experimental Pharmacology, Scientific Book Agency, Calcuta, p. 3-11.

24. Yang, M.G. and Mickelsen, O., Laboratory Animal in Nutritional Research, In : Gay, W.I., 1974, Methods of Animal Experimentation Volume V. Nutrition, Aging and Artificial Organs, Academic Press Inc, San Diego, p. 1-24.
25. Burke, R.W., Diamondstone, B.I., Velapoldi, and Menis, O., 1974, Mechanisms of the Liebumann-Burchard and Zak color Reactions for Cholesterol, Clinical Chemistry 20, p.794-801.
26. Zak, B., 1977, Cholesterol Methodologies, A Review, Clinical Chemistry, 23, p. 1201-1214.
27. Huang, T.C., Chen, C.P., Wefler, V. and Raftery, A., 1961, A stable Reagent for the Liebermann-Burchard Reaction, Application to Rapid Serum Cholesterol Determination, Analytical Chemistry, 33, p. 1405-1407.
28. Warnick, G.R., Cheung, M.C. and Alber, J.J., 1979, Comparison of Current Methods for High Density Lipoprotein Cholesterol Quantitation, Clinical Chemistry, 25, p. 586-604.
29. Donbrow, M., Instrumental Methods in Analytical Chemistry, Vol. II, Ditman and Sons Ltd, London, p. 29-63.
30. Anonim, 1979, Farnacope Indonesia III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, p. 772-773.
31. Anonim, 1990, United States Pharmacopoeia XXII, United States Pahrnacopeial Convention Inc, Rockville, p. 1710-1712.
32. Anonim, 1967, Specifications for the Quality Control of Pharmaceutical Preparations, Second Edition, Pharmacopoea International, WHO, Geneva, p. 20-21.
33. Skoog, D.A., 1985, Principles of Instrumental Analysis, Third Edition, Saunders College Publishing, Philadelphia, p. 210-212.
34. Smith, J.B. and Mangkoewidjojo, S., 1987, The Care, Breeding, and Management of Experimental Animals for Research in the Tropics, International Development Program of Australian Universities and College limited (CDP), Canberra, p. 36-44.
35. Daniels, W.W., 1974, Biostatisties A Foundation for Analysis in Health Sciesces, Second Edition, John Wiley and Sons, p. 220, 254-277.

36. Dowdy, S., Wearden, S., 1983, **Statistics for Research**, John Wiley and Sons, p. 363-381.
37. Dixon, W.J., and Massey, J.S., 1983, **Introduction to Statistical Analysis**, Fourth Edition, MC Graw-Hill Publishing Company, New York, p. 256-300.



LAMPIRAN 1

Perhitungan Koefisien Korelasi

Perhitungan Koefisien Korelasi

No.	X	Y	X Y	X ²	Y ²
1	10,06	0,022	2,21	10120,36	0,0005
2	25,16	0,054	13,59	63302,56	0,0029
3	51,70	0,118	61,01	1016064,00	0,0138
4	100,80	0,173	174,38	1016064,00	0,0299
5	200,80	0,373	748,98	4032064,00	0,1391
6	310,20	0,567	1758,83	9622404,00	0,3215
7	396,80	0,725	2876,80	15745024,00	0,5256
8	517,00	0,985	5092,45	26728900,00	0,9702
	16125,20	3,017	10728,26	57485167,92	2,0037

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{\left\{ (n \sum x^2) - (\sum x)^2 \right\} \left\{ (n \sum y^2) - (\sum y)^2 \right\}}}$$

$$= \frac{(8)(10728,26) - (16125,2) - (3,017)}{\sqrt{\{(8)(57485167,92) - (16125,2)^2\} \{(8)^2(2,0037) - (3,017)^2\}}}$$

$$= 0,9981$$

$$\begin{aligned}
 b &= \frac{n \cdot \sum xy - (\sum x) (\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \\
 &= \frac{(8)(10728,26) - (10125,2) \cdot (3,017)}{(8) (57485167,92) - (10125,2)^2} \\
 &= 1,8601 \cdot 10^{-4}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 a &= \frac{\sum y - b \sum x}{n} \\
 &= \frac{(3,017) - (1,8601 \cdot 10^{-4})(10125)}{8} \\
 &= 0,0022
 \end{aligned}$$

Persamaan garis yang didapat :

$$Y = 1,8601 \cdot 10^{-4} + 0,0022$$

LAMPIRAN 2

Penentuan LOD dan LOQ

Hasil Pengamatan serapan blanko

No.	Serapan	(x - \bar{x})	(x - \bar{x}) ²
1	0,019	0,0013	1,69 . 10 ⁻⁶
2	0,018	0,0003	9,00 . 10 ⁻⁸
3	0,017	0,0007	4,90 . 10 ⁻⁷
4	0,018	0,0003	9,00 . 10 ⁻⁸
5	0,016	0,0017	1,69 . 10 ⁻⁶
6	0,019	0,0013	1,69 . 10 ⁻⁶
7	0,017	0,0007	4,90 . 10 ⁻⁷
8	0,018	0,0003	9,00 . 10 ⁻⁸
9	0,018	0,0003	9,00 . 10 ⁻⁸
10	0,017	0,0007	4,90 . 10 ⁻⁷
	$\bar{x} = 0,0177$		8,10 . 10 ⁻⁶

$$\begin{aligned}
 s &= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \\
 &= \sqrt{8,10 \cdot 10^{-6}} \\
 &= 9,48 \cdot 10^{-4}
 \end{aligned}$$

3. Perhitungan L.O.D.

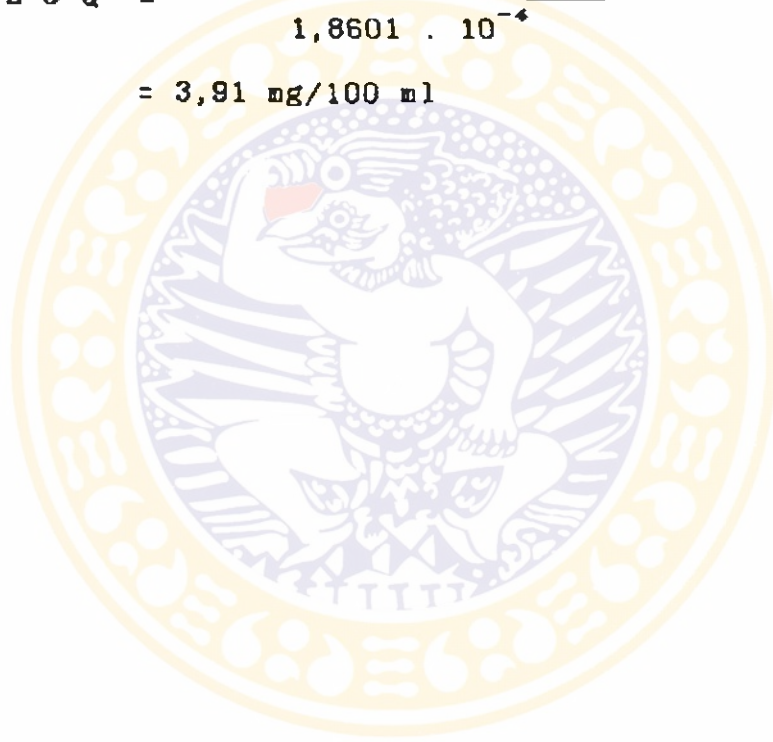
$$\begin{aligned}
 3 \times s &= 3 \times 9,48 \cdot 10^{-4} \\
 &= 2,84 \cdot 10^{-3}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{L O D} &= \frac{(2,84 \cdot 10^{-3}) - 0,0022}{1,8601 \cdot 10^{-4}} \\ &= 0,34 \text{ ng/100 ml} \end{aligned}$$

4. Perhitungan L O Q

$$\begin{aligned} 10 \times S &= 10 \times 9,48 \cdot 10^{-4} \\ &= 9,48 \cdot 10^{-3} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{L O Q} &= \frac{(9,48 \cdot 10^{-3}) - 0,0022}{1,8601 \cdot 10^{-4}} \\ &= 3,91 \text{ ng/100 ml} \end{aligned}$$



LAMPIRAN 3

Analisis data uji Anakova
untuk penentuan kolesterol total serum tikus putih

* Untuk kelompok I, II.1, II.2, II.3

I		II.1		II.2		II.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
70,32	90,75	57,42	67,63	47,74	55,27	90,21	61,72
63,33	85,37	50,97	63,87	64,94	71,39	84,83	72,47
69,78	86,45	46,13	57,85	65,48	78,38	97,20	60,64
75,69	106,88	61,18	70,86	59,03	69,24	72,47	52,57
61,18	79,46	54,73	71,13	61,45	69,78	110,64	91,82
340,30	448,91	270,43	331,44	298,64	344,06	455,35	339,20
68,06	89,78	54,09	66,29	59,73	68,81	91,07	67,84

$$S_{xx} = (70,32)^2 + (63,33)^2 + \dots + (110,64)^2 - \frac{(1364,72)^2}{20}$$

$$= 5254,62$$

$$S_{xy} = (70,32)(90,75) + (63,33)(85,37) + \dots + (110,64)(91,82)$$

$$- \frac{(1364,72)(1463,61)}{20}$$

$$= 1301,39$$

$$T_{xx} = \frac{(340,30)^2 + (270,43)^2 + \dots + (455,35)^2}{5} - \frac{(1364,72)^2}{20}$$

$$= 3970,16$$

$$T_{xy} = \frac{(340,30)(448,91) + (270,43)(331,44) + \dots + (455,35)(339,20)}{5}$$

$$- \frac{(1364,72)(1463,61)}{20}$$

$$= 49,15$$

$$T_{yy} = \frac{(448,91)^2 + (331,44)^2 + \dots + (339,20)^2}{5} - \frac{(1463,61)^2}{20}$$

$$= 1853,61$$

$$E_{xx} = 5254,62 - 3970,16 = 1284,46$$

$$E_{xy} = 1301,39 - 49,15 = 1252,24$$

$$E_{yy} = 3609,87 - 1853,61$$

$$= 1756,26$$

$$S_E = 1756,26 - \frac{(1252,24)^2}{1284,46}$$

$$= 535,43$$

$$S_{T+E} = 1756,26 - \frac{(1301,39)^2}{5254,62}$$

$$= 3287,56$$

$$S_{T+E} - S_E = 3278,56 - 535,43$$

$$= 2752,13$$

Tabel Anakova pro CRD

Sumber variasi	db	Jk			Dikoreksi		
		Σxx	Σxy	Σyy	Jks	db	Rjk
Antar Kelompok	3	3970,16	49,15	1853,61		
Dalam kelompok	16	1284,46	1252,24	1756,26	535,43	15	35,70
Jumlah	19	5254,62	1301,39	3609,87	3287,56	18	...
					2752,13	3	917,38

$$F_{hitung} = \frac{917,38}{35,70} = 25,70$$

$$F_{\text{tabel}} (\alpha = 0,05) = 3,29 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3 \\ V_2 = 15$$

$$F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$$

$$F_{\text{hitung regresi}} = \frac{1220,63}{35,70} = 34,20$$

$$F_{\text{tabel}} (\alpha = 0,05) = 4,54, \text{derajat bebas } V_1 = 1 \\ V_2 = 15$$

$$F_{\text{hitung}} > F_{\text{tabel}}$$

* Untuk kelompok III, IV.1, IV.2, IV.3

II		IV.1		IV.2		IV.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
160,74	202,03	170,85	121,39	157,41	110,64	148,27	80,53
175,69	214,40	121,39	94,51	136,44	73,01	160,10	63,33
148,27	174,61	166,01	104,73	141,28	68,71	151,50	71,39
189,94	247,19	141,28	114,94	133,22	90,32	137,52	50,43
169,78	210,63	131,07	74,62	129,88	63,33	169,24	73,54
884,42	1048,66	730,60	510,19	698,34	406,01	766,63	339,22
166,68	209,77	146,12	102,04	139,67	81,20	153,33	67,84

$$E_{xx} = 3891,34$$

$$E_{xy} = 3583,97$$

$$E_{yy} = 6097,07$$

$$S_E = 2796,19$$

$$S_{T+E} = 38523,97$$

$$S_{T+E} - S_E = 35727,78$$

Tabel Anakova pro CRD

Sumber variasi	db	Jk			Dikoreksi		
		Σxx	Σxy	Σyy	Jk ₀	db	Rjk
Antar Kelompok	3	2367,40	10153,00	62577,78
Dalam kelompok	16	3081,34	3583,97	6097,07	2796,19	15	186,41
Jumlah	19	6258,74	13737,05	68674,85	38523,97	18	...
					35727,78	3	11909,26

$$F_{hitung} = \frac{11909,26}{186,41} = 63,89$$

$$F_{tabel} (\alpha = 0,05) = 3,28 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3 \\ V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

$$F_{hitung \text{ regresi}} = \frac{3300,88}{186,41} = 17,71$$

$$F_{tabel} (\alpha = 0,05) = 4,54, \text{derajat bebas } V_1 = 1 \\ V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

LAMPIRAN 4

Analisis data uji Anakova
untuk penentuan kolesterol HDL serum tikus putih

* Untuk kelompok I, II.1, II.2, II.3

I		II.1		II.2		II.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
57,95	49,94	54,11	60,25	68,48	70,82	58,29	73,43
49,06	53,08	64,14	70,96	60,27	69,88	67,69	72,55
57,62	58,96	62,69	67,54	55,67	65,03	62,39	67,20
48,16	53,72	50,78	55,24	55,38	58,07	70,33	84,67
53,43	51,28	56,77	57,29	58,32	71,50	50,92	63,70
266,22	266,99	288,49	311,28	299,12	335,30	307,62	361,55
53,24	53,40	57,70	62,26	58,82	67,06	61,92	72,31

$$S_{xx} = 770,08$$

$$S_{xy} = 870,18$$

$$S_{yy} = 1622,51$$

$$T_{xx} = 206,58$$

$$T_{xy} = 446,54$$

$$T_{yy} = 968,13$$

$$E_{xx} = 563,50$$

$$E_{xy} = 423,64$$

$$E_{yy} = 654,38$$

$$S_E = 262,11$$

$$S_{T+E} = 639,22$$

$$S_{T+E} - S_E = 377,11$$

Tabel Anakova pro CRD

Sumber variasi	db	Jk			Dikoreksi		
		Σxx	Σxy	Σyy	Jks	db	Rjk
Antar Kelompok	3	206,58	446,54	968,13		
Dalam kelompok	16	563,50	423,64	654,38	262,11	15	17,47
Jumlah	19	770,08	870,18	1622,51	639,22	18	...
					377,11	3	125,70

$$F_{hitung} = \frac{125,70}{17,47} = 7,19$$

$$F_{tabel(\alpha=0,05)} = 3,29 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

$$F_{hitung \text{ regresi}} = \frac{318,49}{17,47} = 18,23$$

$$F_{tabel(\alpha=0,05)} = 4,54 ; \text{derajat bebas } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

* Untuk kelompok III, IV.1, IV.2, IV.3

I		II.1		II.2		II.3	
X	Y	X	Y	X	Y	X	Y
47,42	45,05	46,18	62,35	57,31	74,73	51,78	82,65
50,73	52,10	71,88	84,08	60,60	80,01	56,35	80,96
64,83	63,98	52,08	78,95	64,43	83,57	61,68	84,94
50,88	53,89	63,85	68,13	57,22	87,98	57,78	80,81
55,98	56,35	57,75	77,28	72,27	88,96	55,52	78,08
269,85	271,37	291,75	371,36	311,83	415,25	283,11	407,44
53,97	54,27	58,35	74,36	62,37	83,05	56,62	81,49

$$S_{xx} = 982,81$$

$$S_{xy} = 1034,73$$

$$S_{yy} = 3273,79$$

$$T_{xx} = 186,02$$

$$T_{xy} = 541,63$$

$$T_{yy} = 2626,07$$

$$E_{xx} = 796,79$$

$$E_{xy} = 493,10$$

$$E_{yy} = 647,72$$

$$S_E = 342,56$$

$$S_{T+E} = 2184,40$$

$$S_{T+E} - S_E = 1841,84$$

Tabel Anakova pro CRD

Sumber variasi	db	Jk			Dikoreksi		
		Σxx	Σxy	Σyy	Jks	db	Rjk
Antar Kelompok	3	186,02	541,63	2626,07		
Dalam kelompok	16	786,79	493,10	647,72	342,56	15	22,84
Jumlah	19	982,81	1034,73	3273,79	2184,40	18	...
					1841,84	3	613,95

$$F_{hitung} = \frac{613,95}{22,84} = 26,88$$

$$F_{tabel(\alpha=0,05)} = 3,28 ; \text{derajat bebas } V_1 = 3$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

$$F_{hitung \text{ regresi}} = \frac{305,16}{22,84} = 13,36$$

$$F_{tabel(\alpha=0,05)} = 4,54 ; \text{derajat bebas } V_1 = 1$$

$$V_2 = 15$$

$$F_{hitung} > F_{tabel}$$

LAMPIRAN 5

Penentuan kestabilan reaksi warna dengan larutan baku kolesterol 501,3 mg/100 ml

Panjang gelombang (nm)	Serapan (A)	A setelah 20 menit
616	0,794	0,768
617	0,786	0,772
618	0,797	0,773
619	0,798	0,775
620	0,788	0,778
621	0,798	0,778
622	0,797	0,776
623	0,784	0,775

LAMPIRAN 6

TABEL HARGA KOEFISIEN KORELASI
PADA DERAJAD KEPERCAYAAN 5 % DAN 1 %

DEGREES OF FREEDOM (DF)	5 PERCENT	1 PERCENT	DEGREES OF FREEDOM (DF)	5 PERCENT	1 PERCENT
1	.997	1.000	24	.388	.496
2	.950	.990	25	.381	.487
3	.878	.959	26	.374	.478
4	.811	.917	27	.367	.470
5	.754	.874	28	.361	.463
6	.707	.834	29	.355	.456
7	.666	.798	30	.349	.449
8	.632	.765	35	.325	.418
9	.602	.735	40	.304	.393
10	.576	.708	48	.288	.372
11	.553	.684	50	.273	.354
12	.532	.661	60	.250	.325
13	.514	.641	70	.232	.302
14	.497	.623	80	.217	.283
15	.482	.606	90	.205	.267
16	.468	.590	100	.195	.254
17	.456	.575	125	.174	.228
18	.444	.561	150	.159	.208
19	.433	.549	200	.138	.181
20	.423	.537	300	.113	.148
21	.413	.526	400	.098	.128
22	.404	.515	500	.088	.115
23	.396	.505	1000	.062	.081

LAMPIRAN 7

TABEL DISTRIBUSI F PADA DERAJAD KEPERCAYAAN 5 %

Denominator Degrees of Freedom	Numerator Degrees of Freedom								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38
3	10.13	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81
4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00
5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77
6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10
7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68
8	5.32	4.45	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39
9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18
10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02
11	4.84	3.97	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90
12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80
13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71
14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65
15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59
16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54
17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49
18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46
19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42
20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39
21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37
22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34
23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32
24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30
25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28
26	4.23	3.37	2.98	2.74	2.59	2.47	2.39	2.32	2.27
27	4.21	3.35	2.96	2.73	2.57	2.46	2.37	2.31	2.25
28	4.20	3.34	2.95	2.71	2.56	2.45	2.36	2.29	2.24
29	4.18	3.33	2.93	2.70	2.55	2.43	2.35	2.28	2.22
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.17	2.09	2.02	1.96
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88