

BAB II

LANDASAN TEORI

A. Tinjauan Pustaka

1. Kolesterol

a. Definisi

Kolesterol merupakan senyawa lemak kompleks yang dihasilkan dari dalam tubuh sebanyak 80% terutama oleh organ hati dan yang dihasilkan dari luar tubuh sebanyak 20% oleh zat makanan, yang memiliki fungsi untuk pembentukan dinding sel (Utama & Indasah, 2021). Kadar kolesterol darah normal pada tikus yaitu 10-54 mg/dl (Smith & S, 1998).

b. Patofisiologi

Kolesterol merupakan suatu komponen lemak darah yang tidak dibutuhkan lagi, karena makanan yang telah disintesis dalam tubuh sudah cukup. Normalnya, kolesterol diproduksi sendiri dalam tubuh sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan (Salsabilla, 2019). Tingginya kadar kolesterol (*hiperkolesterolemia*) dalam tubuh dapat dipicu oleh pola hidup yang tidak sehat seperti mengkonsumsi makanan yang tinggi lemak dan makanan cepat saji (*fast food*) (Puspitasari, 2014; Hendra & Rahmad, 2018).

Hiperkolesterolemia merupakan keadaan tingginya fraksi lemak darah dan terjadi peningkatan nilai kolesterol total dalam darah diatas nilai normal (>240 mg/dL) (Octavia *et al.*, 2015). Faktor

hiperkolesterolemia selain dari pola hidup yang tidak sehat juga dapat ditimbulkan oleh faktor keturunan, kelebihan berat badan, kurangnya aktivitas fisik, kurang olahraga, merokok serta mengkonsumsi alkohol (Mumpuni & Ari, 2011).

c. Jenis – jenis

Kolesterol terdiri dari beberapa macam diantaranya kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*), kolesterol HDL (*High Density Lipoprotein*), Trigliserida (TG), dan kolesterol tinggi (Utama & Indasah, 2021).

1) Kolesterol LDL

Kolesterol LDL (*Low Density Lipoprotein*) merupakan jenis kolesterol jahat dan berbahaya. Jenis kolesterol ini yang paling banyak menimbulkan penyakit salah satunya yaitu penyakit jantung koroner. Tingginya kadar LDL dalam darah dapat menimbulkan endapan pada arteri yang menyebabkan disfungsi endotel pada proses awal terbentuknya plak aterosklerosis (Aprilia & Dewiastuti, 2018).

Tabel 1. Klasifikasi Kolesterol LDL

No.	Batas	Keterangan
1	Kurang dari 100	Optimal
2	100-129	Mendekati Normal
3	130-159	Batas Normal Tinggi
4	160-189	Tinggi
5	Lebih dari 190	Sangat Tinggi

LDL dapat melekat dalam pembuluh darah karena mengalami suatu oksidasi. LDL yang telah teroksidasi pertama akan memicu

terbentuknya zat yang dapat melekatkan monosit dan mengubahnya menjadi makrofag. Sementara itu, LDL yang telah teroksidasi akan melalui tahapan kedua yaitu LDL teroksidasi sempurna dimana terjadi ketika makrofag berubah menjadi sel busa yang semakin lama akan membentuk gumpalan dan mengakibatkan penyempitan pembuluh darah (Utama & Indasah, 2021).

2) Kolesterol HDL

High Density Lipoproteins (HDL) atau lipoprotein berat, HDL disebut kolesterol baik karena bertanggung jawab mengurasi kelebihan kolesterol jahat yang dibawa di pembuluh darah arteri kembali ke hati guna didaur ulang atau degradasi. Saat proses *aterosklerosis* (membentuknya plak pada dinding pembuluh darah), HDL membantu mencegah pengendapan kolesterol dan melindungi dinding pembuluh darah (Utama & Indasah, 2021).

Proses dimulai saat LDL (*Low Density Lipoproteins*) mengangkut kolesterol yang diperlukan oleh sel-sel tubuh, termasuk sel otot jantung, otak, dan lain-lain agar dapat berfungsi dengan semestinya. Kolesterol berlebih akan dibawa kembali ke hati oleh HDL untuk selanjutnya diuraikan dan dibuang sebagai asam (cairan) empedu dalam kandung empedu. Protein inti yang membentuk HDL adalah *apolipoprotein* (Apo-A), HDL sendiri cenderung lebih berat karena kandungan lemak lebih sedikit dan memiliki kepadatan yang tinggi (Utama & Indasah, 2021).

3) Trigliserida

Trigliserida juga mempunyai peran penting, Trigliserida merupakan lemak jenis yang terdapat dalam darah dan berbagai organ dalam tubuh. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kadar trigliserida dalam darah, antara lainnya kegemukan, mengonsumsi alkohol, gula, dan mengonsumsi makanan berlemak. Diet rendah karbohidrat dapat mengontrol tingginya kadar trigliserida. Trigliserida tinggi dapat menimbulkan gangguan tekanan darah dan risiko diabetes, bahkan peningkatan trigliserida dapat Menambah risikp terjadinya penyakin jantung dan stroke. Trigliserida sendiri dapat meningkat kala seseorang mengonsumsi alkohol, tinggi gula atau lemak, serta gaya hidup (Utama & Indasah, 2021).

4) Kolesterol Tinggi

Penderita kolesterol tinggi berbadan gemuk, namun tidak menutup kemungkinan yang berbadan kurus juga dapat menderita kolesterol tinggi. Kebiasaan jenis makanan yang dikonsumsi sehari-hari merupakan faktor yang dapat menimbulkan peningkatan kolesterol dalam tubuh, dimana kolesterol sendiri berasal dari makanan yang dikonsumsi. Keseimbangan kolesterol bisa dikontrol dengan semakin baiknya pola dan kualitas makanan yang dikonsumsi sehari-hari. Selain factor makanan, keturunan juga dapat

menyebabkan tingginya kadar kolesterol dalam tubuh (Utama & Indasah, 2021).

d. Pengobatan

Terdapat beberapa jenis golongan obat dengan efek berbeda yang digunakan pada pengobatan kolesterol LDL, HDL, dan trigliserida. Contoh golongan obat kolesterol seperti golongan statin, resin asam empedu, niasin, fibrat, ezetimib, asam lemak omega tiga, dan agen yang bermunculan dan eksperimental.

1) Golongan statin

Beberapa tahun terakhir, statin menjadi pilihan utama pengobatan hiperlipidemia, dimana statin bekerja sebagai inhibitor HMG-Coa reduktase, enzim yang mengkatalisis sesi yang membatasi jalan pada biosintesis kolesterol. Statin dapat menyebabkan peningkatan reseptor LDL di hepar karena strukturalnya berkaitan dengan HMG-Coa dan inhibisi kompetitif enzim. Statin menjadi mediator kombinasi penurunan sintesis kolesterol dan meningkatnya ambilan LDL yang mampu menyebabkan penurunan konsentrasi LDL sebanyak 20% hingga 60%. Statin dapat juga menjadi opsi terapi untuk menurunkan konsentrasi trigliserida plasma 10% sampai 20% dan mampu meningkatkan HDL 10% karena meningkatna apolipoprotein A-1 (Teguh & Panji, 2017).

Atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin, dan rosuvastatin merupakan obat yang tergolong kelas ini yang setara dan relatif bebas efek samping. Atorvastatin, fluvastatin, dan rosuvastatin terbentuk dari senyawa nintetik murni. Lovastatin adalah satu-satunya yang terbentuk secara alami yang terisolasi di salah satu galur *Aspergillus terreus*, sedangkan simvastatin dan pravastatin terbentuk secara sintetis yang diturunkan dari fermentasi jamur yang sama (Taylor *et al.*, 2013).

Setelah pemberian oral, penyerapan statin pada traktus gastrointestinal berbeda-beda. Penyerapan dapat menurun karena efek resin yang mengikat asam empedu. Metabolisme sangat dibutuhkan untuk produk lovastatin dan simvastatin berubah menjadi bentuk asam β -hidroksi. Asupan makanan dapat meningkatkan konsentrasi plasma lovastatin, namun efek tersebut tidak terlalu berpengaruh terhadap statin lainnya. Kecuali untuk pravastatin, seluruh statin secara kuat berkaitan dengan protein. Semua statin mengalami metabolisme ekstensif di hepar oleh enzim P450 hepar, kecuali pravastatin. Atorvastatin memiliki waktu paruh terlama yakni 14 jam, dimana statin lain mempunyai waktu paruh eliminasi sekitar 1 sampai 4 jam. Durasi efek farmakologisnya berlangsung 24 jam, walaupun waktu paruh eliminasi yang sangat singkat (Teguh & Panji, 2017).

Gangguan gastrointestinal, kelelahan, dan nyeri kepala merupakan efek samping yang sering ditimbulkan oleh terapi statin. Efek samping terkait otot skelet juga efek samping yang paling umum dari statin. Dimana keadaan ini terjadi mulai dari myalgia sederhana hingga miositis dengan peningkatan kreatin kinase hingga rhabdomiliosis yang mengancam nyawa dengan ditandai peningkatan CK yang dapat mencapai 10 kali lipat lebih tinggi (Teguh & Panji, 2017).

Mialgia dilaporkan pada 30% pasien yang diberikan terapi statin pada klinik dan lebih umum pada pasien dengan faktor risiko tertentu, sedangkan miositis dan rhabdomiolisis cukup jarang terjadi pada uji klinis yang sebanding dengan frekuensi kelompok yang diberi plasebo. Miotoksitas mungkin terjadi saat proses inhibisi enzim HMG-CoA reduktase, dimana statin tidak hanya menurunkan sintesis kolesterol tetapi juga pembentukan ubiquinon yang penting untuk fungsi mitokondria dan integritas membran sel (Teguh & Panji, 2017).

Peningkatan konsentrasi aminotransferasi plasma yang persisten terjadi pada 0,5% hingga 2% pasien yang ditatalaksana dengan statin dan bersifat tergantung dosis. pada pengobatan statin dihentikan apabila konsentrasi pada aminotransferasi plasma meningkat lebih dari tiga kali dari konsentrasi normal.

Perkembangan menjadi gagal hepar sangat jarang terjadi (Teguh & Panji, 2017).

2) Golongan resin asam empedu

Resin asam empedu merupakan obat yang manjur untuk penatalaksanaan gangguan lipid, dimana abnormalitas utamanya adalah peningkatan kadar kolesterol LDL plasma dengan kadar trigliserida yang normal atau hampir normal. Colesevalam, kolestiramin, dan kolestipol merupakan obat yang termasuk ke dalam kelas ini yang memiliki potensi dibawah rerata untuk mengakibatkan toksisitas dan biasanya ditoleransi dengan baik. Penggunaan obat harus dihidrasi terlebih dahulu karena obat hanya tersedia dalam bentuk bubuk/serbuk. Tidak ada penyerapan sistemik dari resin. Resin asam empedu hanya sebagai monoterapi, dimana resin yang mengikat asam empedu dapat menurunkan konsentrasi plasma kolesterol LDL 15% sampai 30%. Pasien yang mendapatkan terapi resin dapat berdampak pada peningkatan produksi VLDL karena konsentrasi trigliserida plasma meningkat sebesar 5% hingga 20% (Teguh & Panji, 2017).

Resin asam empedu bekerja dengan cara mengikat empedu pada usus, yang menyebabkan terjadinya gangguan sirkulasi enterohepatik serta dapat meningkatkan ekskresi feses dimana sintesis asam empedu pada hati dari simpanan kolesterol meningkat. Hal ini menyebabkan produksi LDL-R di hati

meningkat dan konsentrasi kolesterol LDL plasma mengalami penurunan. Aktivitas HMG-CoA reduktase juga mengalami peningkatan (Teguh & Panji, 2017).

Terapi kolestiramin memiliki efek paling yang sering dikeluhkan adalah palabitias dan konstipasi. Konstipasi dapat diminimalisir dengan mengonsumsi asupan cairan yang tinggi. Colesvelam mempunyai efek samping gastrointestinal yang lebih sedikit dan sudah memiliki izin untuk digunakan pada remaja dengan hiperkolesterolemia familial (Teguh & Panji, 2017).

3) Niasin

Asam nikotin (niasin) merupakan jenis vitamin B kompleks yang larut air yang menghambat sintesis VLDL di hepar melalui mekanisme yang belum diketahui. Niasin juga menghambat pelepasan asam lemak dari jaringan adiposa dan meningkatkan aktivitas lipase lipoprotein. Penurunan kolesterol LDL plasma dari 15% sampai 30%, penurunan kadar trigliserida sebanyak 20% sampai 50%, dan peningkatan HDL sebanyak 20% hingga 30% merupakan efek-efek yang masih tergantung dari jumlah dosis (Gotto & Moon, 2013).

Efek samping yang diderita pasien terapi niasin adalah kemerahan pada kulit yang intens yang diinduksi oleh prostaglandin yang terjadi pada satu per sepuluh pasien. Alkohol dapat memperparah kemerahan kulit, sedangkan aspirin yang diberikan

30 menit sebelum pemberian niasin dapat mengurangi efek kemerahan. Keluhan paling umum yang didapatkan pasien dengan terapi niasin antara lain nyeri abdomen, mual, muntah, diare dan malaise (Teguh & Panji, 2017).

4) Fibrat

Fibrat merupakan turunan dari asam fibrat dan merupakan obat yang paling efektif dalam menurunkan kadar trigliserida plasma. Fibrat dimulai kembali setelah pasien pasca operasi dalam status hidrasi yang baik dan mampu mengonsumsi obat oral. Gemfibrozil, fenofibrat, dan bezafibrat merupakan tiga derivat asam fibrat yang umum digunakan untuk tatalaksana hiperlipidemia. Peningkatan konsentrasi HDL sebanyak 10% sampai 35% dan penurunan konsentrasi trigliserida plasma sebesar 40% hingga 50% adalah hasil dari fibrat tergantung jumlah dosis, sedangkan efeknya pada konsentrasi LDL bervariasi (Tenenbaum & Fisman, 2012).

Peningkatan aktivitas lipase lipoprotein yang distimulasi obat ini kemungkinan besar merupakan mekanisme untuk terjadinya efek penurunan kadar trigliserida yang dihasilkan obat golongan ini. Fibrat dapat merefleksikan aktivasi faktor transkripsi spesifik, yang memiliki dampak pada meningkatnya regulasi gen yang mengkode lipase lipoprotein dan oksidasi asam lemak.

Bezafibrat juga diketahui dapat meningkatkan sensitivitas insulin (Tenenbaum & Fisman, 2012).

2. Bunga Pukul Empat

Bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa L*) merupakan bunga yang berasal dari Meksiko. Bunga ini biasanya akan mekar pada jam empat sore, maka dari itu bunga pukul empat ini sering disebut sebagai bunga ashar. Bunga pukul empat biasanya tumbuh di daerah dataran rendah maupun dataran tinggi dengan berbagai macam warna mulai dari merah, putih, kuning, merah muda, ungu, dan lain-lain (Hidayat & Rodame M, 2015).

a. Klasifikasi bunga pukul empat



Gambar 1. Bunga Pukul Empat (*Mirabilis jalapa L*)

Kingdom : Plantae
Divisio : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Caryophyllales
Familia : Nyctaginaceae
Genus : *Mirabilis*
Spesies : *Mirabilis jalapa L* (Sijabat, 2017).

b. Morfologi

Bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa L*) merupakan tanaman yang memiliki tinggi sekitar 50-80 cm dengan batang tegak, bulat, permukaan yang licin. Tanaman ini memiliki daun tunggal segitiga dengan Panjang 5-8 cm dan lebar 5-10 cm, serta ujungnya yang meruncing, pangkal tumpul, memiliki tepi yang rata, tulang daun menyirip, dan daunnya berwarna hijau keputih-putihan. Tanaman ini memiliki bentuk bunga yang seperti terompet, dengan mahkota bunga 5 cm berdiameter 1-1,5 cm. Buah dari tanaman ini kecil dan keras berwarna hitam, dengan permukaan berkerut, memiliki diameter ± 5 mm, bagian dalam buah berwarna putih dan lunak (Hidayat & Rodame M, 2015).

c. Kandungan senyawa metabolit sekunder bunga pukul empat

Bunga pukul empat (*Mirabilis jalapa L*) memiliki kandungan seperti glikosida, saponin, alkaloid, tanin, antosianin, dan flavonoid (Erlina & Satria, 2017). Kandungan antosianin dalam 10 gram bunga pukul empat memiliki kadar sebesar 0,977% (Nandasari, 2017; Sangadji *et al.*, 2017).

Glikosida merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang berikatan dengan senyawa gula. Gula ini terikat dengan atom C pada ikatan glikosida. Glikosida dapat berikatan dengan atom lain seperti atom O, N, S, dan C. Contoh dari masing-masing atom yang berikatan dengan glikosida antara lain O- (O-glikosida), N- (glikosida amin), S- (thioglikosida), C- (C-glikosida) (Julianto, 2019).

Saponin merupakan suatu senyawa yang dapat menghasilkan buih atau busa yang permanen setelah digojok dengan air. Contoh senyawa saponin yaitu liquorice yang memiliki aktivitas ekspektoran, anti-inflamsi (Julianto, 2019).

Alkaloid merupakan suatu senyawa yang paling banyak berasal dari tumbuhan dan mengandung paling sedikit satu atom N yang bersifat basa (Kristanti *et al.*, 2008). Alkaloid larut dalam pelarut organik, mudah larut dalam alkohol, dan sedikit larut dalam air. Pada umumnya bentuk dari alkaloid ini adalah padatan kristal contohnya senyawa atropine, akan tetapi ada juga yang berbentuk cairan seperti lobeline atau nikotin (Julianto, 2019).

Tanin merupakan salah satu senyawa fenolik yang terdapat pada metabolit sekunder. Senyawa ini memberikan rasa pahit dan sepat serta dapat bereaksi dengan cara menggumpalkan protein atau senyawa lain yang mengandung asam amino dan alkaloid (Julianto, 2019). Senyawa tannin paling banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan yang berpembuluh. Tanin ada dua jenis yaitu tannin terkondensasi dan tanin terhidrolisis (Harborne, 1996).

Flavonoid merupakan senyawa fenolik terbesar dan banyak jenisnya. Flavonoid memiliki susunan senyawa yang terdiri dari atom C sebanyak 15 atom. Banyak flavonoid yang telah teridentifikasi seperti senyawa antosianin, flavonol, dan flavon (Julianto, 2019).

Antosianidin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk kedalam flavonoid. Antosianidin yang berikatan dengan glikosidanya dinamakan dengan antosianin (Kristanti *et al.*, 2008). Antosianin merupakan suatu zat warna yang bertanggung jawab memberikan warna orange, merah, ungu, biru, hingga hitam. Antosianin terbentuk dari tiga atom C yang diikat oleh atom O untuk menghubungkan dua cincin benzene (Priska *et al.*, 2018).

Antosianin memiliki fungsi sebagai antioksidan. Antioksidan ini dapat bermanfaat dalam berbagai macam penyakit. Salah satu manfaatnya yaitu pencegahan penyakit kardiovaskular, dengan cara menghambat enzim dan menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Priska *et al.*, 2018). Antosianin ini merupakan senyawa yang diduga dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah, dengan cara menghambat HMG-CoA reduktase serta dapat meningkatkan aktivitas LCAT (*Lechitin Cholesterol Acyl Transferase*) (Fajrin, 2010).

Kandungan yang berkhasiat sebagai antihiperkolesterol dengan cara menghambat HMG-CoA reduktase yaitu antosianin dan flavonoid (Fajrin, 2010; Aprilia & Dewiastuti, 2018).

3. Ekstraksi

a. Definisi

Ekstraksi merupakan suatu metode pemisahan senyawa kimia untuk memisahkan satu atau lebih analit dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Leba, 2017). Jika konsentrasi

senyawa dalam pelarut sudah setimbang dengan konsentrasi dalam sel tanaman maka ekstraksi bisa dihentikan (Mukhriani, 2014). Ekstraksi ini memiliki prinsip pemisahan berdasarkan kemampuan atau daya larut analit dalam suatu pelarut tertentu (Leba, 2017).

b. Jenis-jenis

1) Maserasi

Maserasi adalah salah satu jenis metode ekstraksi yang paling sederhana. Proses ekstraksi ini dilakukan dengan cara merendam sampel kedalam pelarut yang sesuai pada suhu kamar sehingga dapat memisahkan analit dari sampel. Ekstraksi biasanya dilakukan selama 3-5 hari perendaman dengan berulang kali sampai dengan pelarut yang digunakan tidak berwarna (Leba, 2017).

Kelebihan dari ekstraksi ini adalah alat dan cara pengerjaannya yang sangat sederhana dan mudah. Kekurangannya yaitu terlalu banyak menggunakan pelarut.

Ekstraksi bunga pukul empat dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol. Metode maserasi dipilih karena cara pengerjaan sangat sederhana dan peralatan yang digunakan sederhana. Tidak dilakukan proses pemanasan sehingga kandungan bahan alam tidak terurai dan memungkinkan banyak senyawa yang terekstraksi (Erlina & Satria, 2017).

2) Perkolasi

Perkolasi merupakan salah satu jenis ekstraksi yang dilakukan dengan cara mengalirkan pelarut secara perlahan pada sampel diatas suatu perkolator. Ekstraksi ini menggunakan pelarut yang baru secara terus menerus, penambahan pelarut dilakukan dengan pola penetesannya dari bejana terpisah yang disesuaikan dengan jumlah pelarut keluar secara berkala (Leba, 2017).

Proses ekstraksi ini berakhir apabila semua analit telah terekstraksi sempurna dengan ditandai pelarut yang tidak berwarna lagi. Untuk memastikan hasil yang diperoleh dilakukan uji dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan ditandai noda/spot pada pelat KLT atau menggunakan spektrofotometri UV dengan ditandai tidak adanya puncak pada kromatogram (Leba, 2017).

3) Sokhletasi

Sokhletasi merupakan ekstraksi yang menggunakan alat soklet dengan pelarut dan sampel diletakkan secara terpisah. Prinsip dari ekstraksi sokhletasi adalah ekstraksi dilakukan secara terus menerus menggunakan pelarut yang sedikit dan setelah selesai ekstraksi akan diuapkan untuk memperoleh ekstrak. Biasanya pelarut yang digunakan pada ekstraksi ini adalah pelarut yang mudah menguap (Leba, 2017).

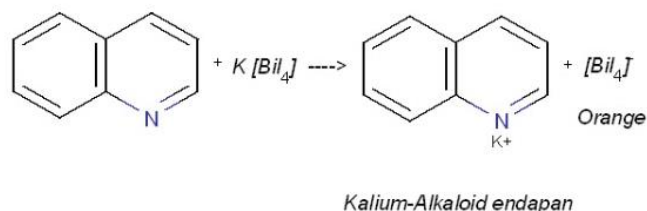
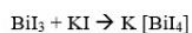
4. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan metode yang digunakan untuk mempelajari komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel yang

diuji. Komponen golongan senyawa kimia dapat ditentukan dengan cara reaksi warna, reaksi pengendapan, dan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

Metode analisis dilakukan secara kualitatif yaitu dengan melakukan uji kandungan metabolit sekunder ekstrak bunga pukul empat yang memiliki kandungan diantaranya yaitu : glikosida, saponin, alkaloid, tannin, antosianin, dan flavonoid (Erlina & Satria, 2017).

1. Alkaloid

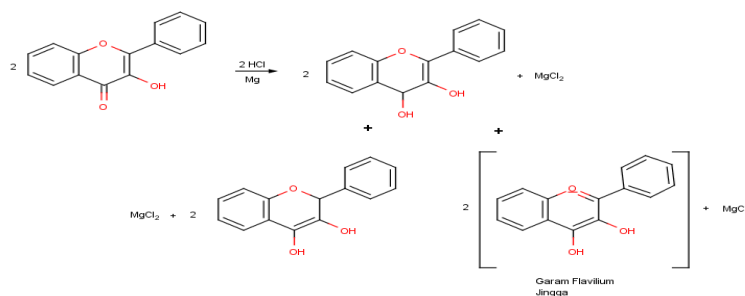


Gambar 2. Reaksi Alkaloid dengan Pereaksi Dragendroff (Marliana *et al.*, 2005)

Uji fitokimia senyawa alkaloid dilakukan dengan mengambil sedikit ekstrak lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditetesi HCl. Hal ini bertujuan agar terjadi reaksi antara senyawa alkaloid yang berifat basa dengan HCl yang bersifat asam dan akan membentuk suatu garam (Muthmainnah B, 2017). Selanjutnya dipanaskan agar senyawa alkaloid yang bukan garam ikatannya terpecah dan didinginkan. Ditambahkan dengan pereaksi warna dragendroff hasilnya menjadi warna orange dan terdapat endapan (Muthmainnah B, 2017).

2. Flavonoid

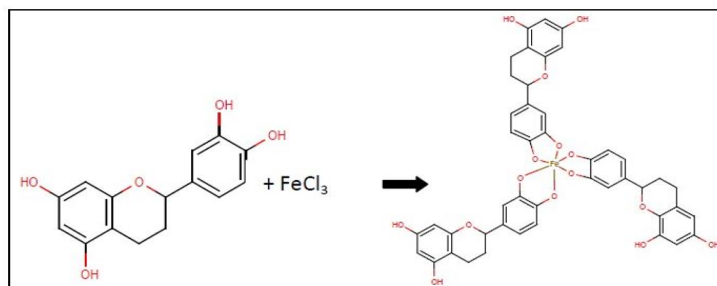
Uji fitokimia senyawa flavonoid dilakukan dengan mengambil 2 ml dan dilakukan menambahkan serbuk magnesium 0,1 gram dan 2 tetes HCl pekat (Oktafiana, 2018). Tujuan dari penambahan serbuk Mg dan HCl yaitu untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid sehingga akan terbentuk garam flavylum berwarna merah atau jingga (Ergina *et al.*, 2014). Flavonoid adalah senyawa yang mengandung dua cincin aromatic dengan gugus hidroksil lebih dari satu.



Gambar 3. Reaksi Flavonoid dengan Logam Mg dan HCL (Ergina *et al.*, 2014)

3. Tannin

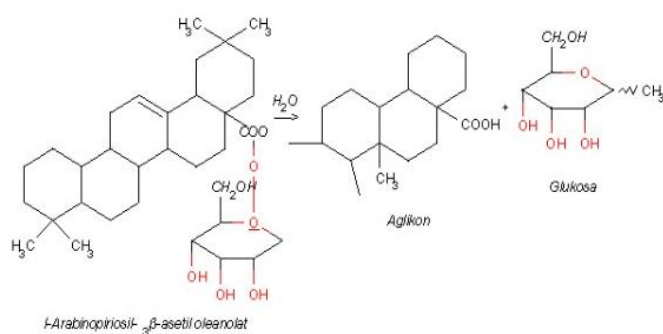
Uji fitokimia senyawa tannin dilakukan dengan menambahkan FeCl₃ menghasilkan perubahan warna menjadi hijau tua/ hijau kehitaman. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak bunga pukul empat mengandung senyawa tannin. Penambahan FeCl₃ akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe³⁺. Ion Fe³⁺ akan mengikat tiga tannin yang memiliki dua atom donor (Ergina *et al.*, 2014).



Gambar 4. Reaksi Tanin dan FeCl₃ (Ergina *et al.*, 2014)

4. Saponin

Uji fitokimia senyawa saponin dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa saponin dalam ekstrak bunga pukul empat. Kandungan senyawa saponin dapat terdeteksi apabila ekstrak yang diuji menunjukkan adanya busa yang terbentuk. Hal ini terjadi karena adanya senyawa glikosida yang memiliki kemampuan dalam membentuk buih/busa dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya.



Gambar 5. Reaksi Saponin dengan Aquades (Marliana *et al.*, 2005)

5. Antosianin

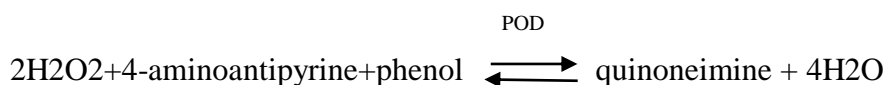
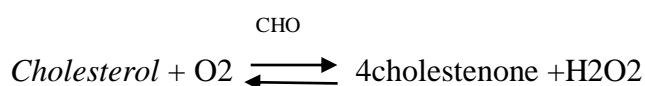
Uji fitokimia senyawa antosianin merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa antosianin dalam ekstrak bunga pukul empat. Antosianin merupakan suatu senyawa yang termasuk ke

dalam golongan senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan dapat menyembuhkan penyakit degeneratif (Dwi Utari *et al.*, 2017). Sampel bunga pukul empat sebanyak 7 ml ditambah 2 tetes NaOH 10%. Jika terjadi perubahan warna menjadi coklat, maka hasil menunjukkan positif mengandung antosianin (Agustin & Ismiyanti, 2015).

5. Metode Pengukuran Kadar Kolesterol

Metode pengukuran kadar kolesterol antara lain metode kolorimetri, dan enzimatik. Metode Lieberman-Burchad merupakan salah satu dari metode kolorimetri dengan prinsip kolesterol asam asetat anhidra dan asam sulfat pekat akan membentuk reaksi warna hijau kecoklatan. Warna ini memiliki hasil absorban yang sebanding dengan kolesterol pada sampel uji. Metode CHOD–PAP merupakan metode enzimatik yang banyak dipergunakan di laboratorium klinik karena hasilnya lebih teliti, hanya saja reagen harus disimpan dengan baik karena enzim mudah rusak. Sebagai biokatalisator enzim akan mereaksikan kolesterol sehingga hasil reaksi yang didapatkan menjadi lebih spesifik (Purbayanti, 2015).

Metode CHOD–PAP memiliki prinsip reaksi :



Metode CHOD–PAP merupakan reaksi enzimatik yang memiliki prinsip kolesterol oksidase sehingga akan menghasilkan peroksida. Terbentuknya

peroksida ditandai adanya warna merah ungu dari empat amino antipirin dan phenol (Murniata, 2019). Aktivitas enzim memiliki nilai yang berbanding terbalik dengan kenaikan dari waktu pada saat inkubasi. Waktu inkubasi yang semakin lama akan menurunkan nilai aktivitas enzim tersebut (Murniata, 2019).

Metode CHOD–PAP akan memperlihatkan nilai linearitas yang baik sampai dengan 500 mg/dL. Sampel yang digunakan harus jernih tidak keruh, lipemik, ikterik, atau hemolisis agar tidak mengganggu pada saat pemeriksaan kadar. Dalam metode enzimatik, bilirubin yang bereaksi dengan H₂O₂ dapat menyebabkan terjadinya interferensi negatif, sehingga mengurangi jumlah peroksida yang tersedia untuk membentuk kompleks berwarna (Murniata, 2019).

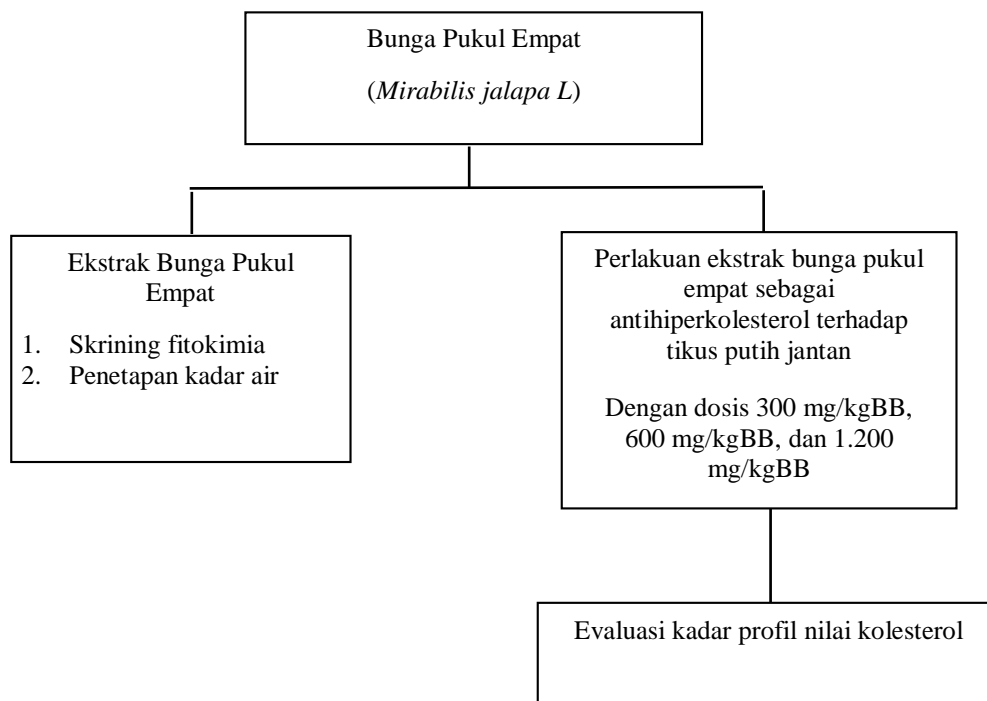
6. Spektrofotometer

Spektrofotometri merupakan metode yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif . Spektrofotometer merupakan alat dari metode spektrofotometri. Alat ini digunakan untuk mengukur absorbansi dengan cara melewatkan cahaya dengan panjang gelombang tertentu pada suatu obyek kaca. Sebagian dari cahaya tersebut diserap dan sisanya akan dilewatkan. Nilai absorbansi dari cahaya yang dilewatkan akan sebanding dengan konsentrasi larutan di dalam kuvet. Alat spektrofotometer terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang

gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Tuntun, 2018).

Spektrofotometer digunakan untuk membaca substrat, produk atau Ko enzim, yang diukur adalah aktivitas dari enzim yang paralel dengan konsentrasi kolesterol. Pengukuran kolesterol secara enzimatis perlu dilakukan persiapan blanko (aquadest) dan sampel. Pembuatan blanko reagen kolesterol total dan sampel harus dilakukan inkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C. Pembacaan kadar kolesterol pada panjang gelombang 510 nm (*Insert kit Mindray*) (Murniata, 2019).

B. Kerangka Berpikir



Gambar 6. Kerangka Berpikir

C. Hipotesis

H₀ : Tidak Ada aktivitas antihiperkolesterolemia ekstrak bunga pukul empat terhadap tikus putih jantan yang diinduksi pakan lemak tinggi.

H₁ : Ada aktivitas antihiperkolesterolemia ekstrak bunga pukul empat terhadap tikus putih jantan yang diinduksi pakan pakan lemak tinggi.