

DAYA ANTIHIPERKOLESTEROLEMIA "ZINKOFILIN" (KOMPLEKS SENG DENGAN FEOFITIN)

[Anthiypercholesterolaemic Activity of "Zincophyllin"]

Alsuhendra ¹⁾, D. Muchtadi ²⁾, D. Sastradipradja ³⁾, dan T. Wresdiyati ⁴⁾

¹⁾ Staf Pengajar PS Tata Boga Jur. IKK Fak. Teknik Universitas Negeri Jakarta, Jl. Rawamangun Muka Jakarta

²⁾ Staf Pengajar dan Guru Besar Jurusan TPG FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

³⁾ Purnabakti Guru Besar FKH-IPB, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor

⁴⁾ Staf Pengajar FKH-IPB, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor

Diterima 23 September 2002/Disetujui 30 Juni 2003

ABSTRACT

Pheophytin was obtained from chlorophyll that was extracted from fresh cassava leaves by use of ethanol. One hundred to 200 ppm of zinc was added to pheophytin to produce a complex of zinc-pheophytin ("zincophyllin").

The antihypercholesterolaemic effect of "zincophyllin" was studied in 20 male New Zealand White rabbits fed on a low-cholesterol (0.1%) diet for 12 weeks. Five animals were given 33.4 mg/d (doses I), 5 animals received 100.2 mg/d (doses II) of "zincophyllin". 5 animals received standard diet as negative controls, and the remaining 5 animals served as cholesterol-fed controls (positive controls).

Animal receiving dose II had significantly lower serum total and LDL-cholesterol concentrations. Positive control group and doses I group had significantly higher serum total cholesterol. Cholesterol concentration of group II slightly increased for 4 weeks, but decreased to normal until 12 weeks. Triglyceride concentration of all rabbits groups were in normal level, but LDL-cholesterol concentration of positive control group and doses I group were higher than others. It was suggested that the antihypercholesterolaemic effect of "zincophyllin" may benefit rabbits by inhibiting the increase of serum cholesterol concentration.

Key words: Chlorophyll, pheophytin, "zincophyllin", hypercholesterolaemic

PENDAHULUAN

Sayuran merupakan bahan makanan yang mempunyai peran penting bagi kesehatan manusia. Konsumsi sayuran telah dikaitkan dengan menurunnya insiden serta angka mortalitas karena kanker, mencegah timbulnya penyakit degeneratif, melengkapi zat gizi yang kurang, memelihara kesehatan tubuh secara umum, memperlambat proses penuaan, memelihara system kekebalan tubuh, mengatasi stress serta membantu menyembuhkan penyakit (Karyadi, 1996).

Perlindungan sayuran terhadap berbagai penyakit seperti penyakit degeneratif dimungkinkan antara lain oleh adanya antioksidan dalam sayuran. Antioksidan merupakan substansi yang dapat menghambat atau mengurangi kerusakan oksidatif suatu molekul. Di dalam tubuh manusia, antioksidan berperan dalam menghancurkan radikal bebas, sehingga tubuh terlindung dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas yang tidak terkontrol.

Klorofil merupakan salah satu antioksidan alami yang banyak ditemukan pada sayuran. Telah dilaporkan bahwa klorofil dan beberapa senyawa turunannya memiliki

daya antioksidan dan antikanker (Breinholt, et al., 1995; Hasegawa, et al., 1995; Keller, et al., 1996 & Tasetti, et al., 1997). Klorofil juga telah ditemukan mempunyai aktivitas sebagai zat antiinflamasi (Okai & Okai, 1997), serta antigenotoksik (Nagishi, Rai & Hayatsu, 1997). Penelitian Vlad, et al., (1995) menggunakan tikus percobaan memperlihatkan efek antiaterosklerosis dari "*cuprofilin*", yaitu suatu kompleks antara klorofil dengan ion tembaga (Cu^{2+}). Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa "*cuprofilin*" mampu menurunkan kadar kolesterol, trigliserida dan lipida serum darah tikus secara nyata.

Meskipun telah terbukti mampu berperan sebagai antioksidan, banyak penelitian yang masih mencoba mempelajari efek biologis dan fisiologis dari klorofil, terutama dalam bentuk turunannya. Salah satu turunan klorofil yang belum banyak dipelajari efeknya bagi tubuh adalah seng-feofitin (atau "*zinkofilin*"). "*zinkofilin*" merupakan suatu kompleks antara ion Zn^{2+} dengan feofitin, yaitu suatu bentuk turunan klorofil, yang dibuat dengan cara mengganti ion Mg^{2+} yang terdapat pada inti porfirin klorofil asal dengan ion Zn^{2+} .

Beberapa penelitian telah memperlihatkan bahwa "*zinkofilin*" merupakan satu senyawa turunan klorofil yang dianggap bertanggung jawab terhadap pembentukan warna

hijau yang lebih cerah pada sayuran. Garam Zn dengan sengaja ditambahkan ke dalam larutan *blanching* pada proses komersial, di Amerika dikenal dengan *Veri-Green*, karena mampu mempertahankan dan meningkatkan warna sayuran hijau yang dikalengkan, seperti kacang polong, buncis dan bayam, bahkan warna yang dihasilkan jauh lebih stabil dibandingkan dengan warna asal (von Elbe, et al., 1986).

Walaupun kompleks Zn-feofitin telah dimanfaatkan dalam proses pengolahan pangan, pengaruh kompleks ini terhadap keadaan biokimia dan histologis tubuh belum banyak dilaporkan. Penelitian ini mempelajari pengaruh tersebut dengan menggunakan hewan percobaan, khususnya menyangkut daya antihiperkolesterolemia dari "*zinkofilin*".

Tujuan penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari daya antihiperkolesterolemia "*zinkofilin*" pada kelinci percobaan.

METODOLOGI

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun singkong, etanol 95%, HCl, akuades, Zn-asetat dihidrat, kertas saring Whatman No. 1 dan 42 dan dekstrin. Untuk menentukan daya antihiperkolesterolemia "*zinkofilin*" diperlukan kelinci strain *New Zealand White* yang diperoleh dari Balai Penelitian Ternak, Ciawi Bogor, ransum kelinci, kit kolesterol, alkohol 70%, dan bahan lainnya yang diperlukan untuk analisis.

Alat

Alat-alat yang diperlukan antara lain blender, pH meter, spektrofotometer UV-VIS, *spray dryer*, seperangkat kandang kelinci, timbangan, spuit 2.5 dan 5 ml, serta alat-alat gelas.

Tahap penelitian

Penelitian dilakukan dalam dua tahap, yaitu :

1. Ekstraksi klorofil, penyiapan feofitin dan pembuatan kompleks Zn-feofitin ("*zinkofilin*")
2. Penentuan daya antihiperkolesterolemia kompleks Zn-feofitin ("*zinkofilin*")

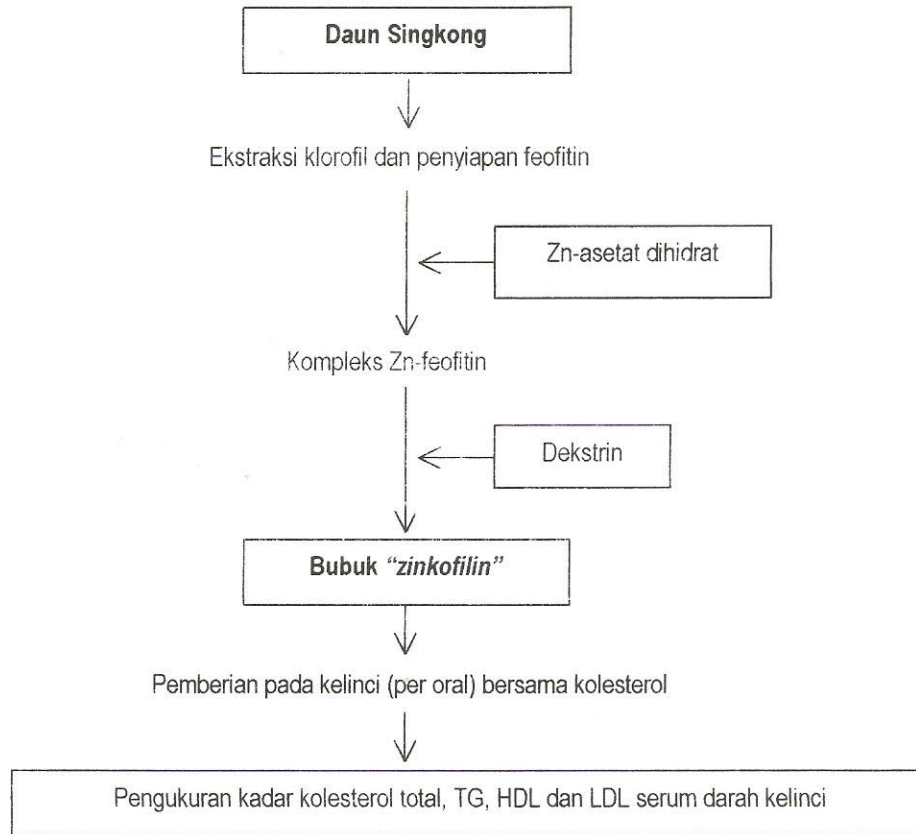
Secara ringkas kedua tahapan tersebut disajikan dalam bentuk diagram alir, seperti dapat dilihat pada Gambar 1.

Ekstraksi klorofil, penyiapan feofitin dan pembuatan kompleks Zn-Feofitin ("*zinkofilin*")

Tahapan ini bertujuan untuk mendapatkan komponen klorofil dari daun singkong yang selanjutnya digunakan untuk penyiapan feofitin dan pembuatan "*zinkofilin*". Ekstraksi klorofil dan penyiapan feofitin dilakukan menurut metode Tonucci dan von Elbe (1992) dengan sedikit modifikasi. Kompleks Zn-feofitin dibuat dengan cara modifikasi metode LaBorde dan von Elbe (1994). Sebanyak 60 ml filtrat yang mengandung feofitin ditambah dengan 2 ml larutan Zn-asetat dihidrat yang mengandung masing-masing 0, 100, 150 dan 200 ppm ion Zn^{2+} . Setelah terbentuk kompleks Zn dengan feofitin, maka kompleks tersebut direaksikan dengan dekstrin. Penambahan dekstrin ini dimaksudkan agar kompleks Zn-feofitin dapat dibuat menjadi bubuk dengan cara mengeringkan pelarut etanol menggunakan pengering semprot (*spray dryer*). Produk terbaik ditentukan berdasarkan karakteristik fisik bubuk "*zinkofilin*" yang dihasilkan, yaitu meliputi kadar air, kadar abu, rendemen, kelarutan, ketahanan terhadap panas, serta pH akhir produk.

Penentuan daya antihiperkolesterolemia "*zinkofilin*"

Tahap ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh pemberian "*zinkofilin*" dalam mencegah kenaikan kadar kolesterol dan trigliserida darah kelinci. Dua puluh ekor kelinci berumur berumur 5-6 bulan dengan jenis kelamin jantan dan berat badan 2-3 kg dibagi menjadi 4 kelompok, sehingga setiap kelompok terdiri dari 5 ekor kelinci. Kelompok I adalah kontrol positif, yaitu kelompok kelinci yang diberi diet tinggi kolesterol (0.1%) tanpa mendapatkan "*zinkofilin*". Kelompok II adalah kontrol negatif, yaitu kelinci yang hanya diberi ransum standar, dan tidak mendapatkan diet tinggi kolesterol serta "*zinkofilin*". Kelompok III adalah kelinci yang mendapatkan diet tinggi kolesterol dan "*zinkofilin*" dengan dosis 33.4 mg/ekor/hari (dosis I). Sedangkan, kelompok IV adalah kelinci yang diberi diet tinggi kolesterol serta "*zinkofilin*" dengan dosis 3 kali lebih tinggi daripada dosis I, yaitu sebanyak 100.2 mg/ekor/hari. Penelitian dilaksanakan selama 12 minggu. "*Zinkofilin*" diberikan secara oral dengan cara mencampurkannya dengan ransum kelinci. Pengamatan terhadap kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL serum darah kelinci dilakukan pada minggu ke-0, 4, 8, dan 12. Contoh darah kelinci diambil dari pembuluh darah vena yang berada pada telinga kelinci.



Gambar 1. Diagram alir tahap penelitian

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan kompleks Zn-Feofitin ("zinkofilin")

Klorofil daun singkong diekstrak dengan menggunakan etanol 95% sebagai pelarut. Penggunaan etanol ini didasarkan pada hasil penelitian Bianca (1993) dan Mahmud (1994) yang memperoleh nilai *recovery* dan derajat kemurnian klorofil lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lain, seperti aseton. Hal ini diduga berkaitan dengan polaritas dan kemiripan sifat struktural antara etanol dengan klorofil.

Dengan menambahkan HCl pada ekstrak klorofil maka akan diperoleh feofitin, karena pada pH rendah klorofil akan melepaskan ion Mg untuk membentuk feofitin. Penambahan ion Zn²⁺ pada feofitin dapat mengakibatkan posisi yang telah dilepaskan oleh ion Mg²⁺ dapat digantikan oleh ion Zn²⁺. Penggantian ini menghasilkan senyawa turunan klorofil yang lebih stabil terhadap panas serta memberikan warna hijau yang lebih terang dibandingkan dengan senyawa klorofil asal (Tonucci & von Elbe, 1992). Jumlah ion Zn²⁺ yang ditambahkan ada 4 tingkat, yaitu 0

ppm, 100 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm. Hal ini dimaksudkan untuk mendapatkan jumlah optimal ion Zn²⁺ yang ditambahkan guna mendapatkan produk "zinkofilin" terbaik.

Untuk memperoleh produk "zinkofilin" dalam bentuk bubuk, maka dilakukan penambahan bahan pengisi pada kompleks Zn-feofitin yang dihasilkan. Bahan pengisi yang ditambahkan adalah dekstrin karena hasil penelitian Bianca (1993) yang mengekstrak klorofil dari daun suji memperlihatkan penggunaan dekstrin lebih baik daripada bahan pengisi lainnya. Dekstrin juga dapat membuat "zinkofilin" menjadi larut dalam air karena sifat dekstrin yang dapat larut dalam air, tetapi mempunyai gugus hidrofobik yang dapat mengikat kompleks Zn-feofitin.

Bubuk "zinkofilin" dapat diperoleh setelah pelarut etanol terlebih dahulu dikeringkan dengan alat pengering semprot (*spray dryer*). Beberapa karakteristik produk "zinkofilin" disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Karakteristik Produk "zinkofilin"

Karakteristik	"zinkofilin" dengan Jumlah Penambahan Ion Zn ²⁺			
	0 ppm	100 ppm	150 ppm	200 ppm
Rendemen (%)	15.0	14.3	13.2	13.3
Kadar Air (%)	2.7 ^b	3.7 ^a	3.2 ^a	3.2 ^a
Kadar Abu (%)	2.5 ^b	3.7 ^a	4.3 ^a	3.8 ^a
Nilai pH	7.23 ^c	7.51 ^b	7.58 ^b	7.69 ^a
Kadar Zn (ppm)	0.0 ^a	50.4 ^b	71.5 ^c	80.3 ^d
Kelarutan (%)	89.4 ^b	90.0 ^b	90.7 ^b	96.2 ^a

Keterangan : Huruf yang sama pada baris yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada $\alpha = 0.05$

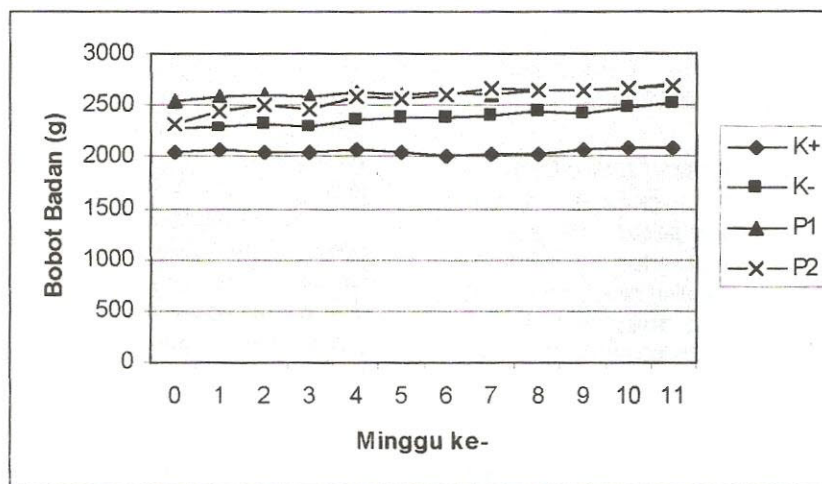
Pengamatan terhadap karakteristik produk "zinkofilin" memperlihatkan bahwa semakin tinggi tingkat penambahan ion Zn²⁺, semakin tinggi pula kadar air, kadar abu, kadar Zn, nilai pH dan kelarutan produk "zinkofilin" yang dihasilkan. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa "zinkofilin" yang dibuat dengan penambahan ion Zn²⁺ sebesar 200 ppm mempunyai nilai pH yang lebih tinggi dan berbeda nyata dibandingkan dengan produk lainnya. Hal ini menguntungkan karena pada pH yang relatif tinggi stabilitas warna "zinkofilin" diharapkan juga akan meningkat. Produk dengan penambahan ion Zn²⁺ ini juga mempunyai kelarutan dan kadar Zn yang paling tinggi. Tingginya kelarutan produk bubuk "zinkofilin" ini disebabkan oleh sifat bahan pengisi dekstrin yang larut dalam air, karena dekstrin memiliki kemampuan untuk mengabsorpsi sejumlah besar air dan membentuk suatu sistem koloidal.

Daya antihiperkolesterolemia "zinkofilin"

Produk "zinkofilin" yang dibuat dengan menambahkan ion Zn²⁺ sebanyak 200 ppm dipilih untuk dilihat daya antihiperkolesterolemianya, karena produk ini mempunyai karakteristik yang lebih baik dibandingkan dengan produk lainnya. Beberapa parameter yang diamati dijelaskan berikut ini.

Bobot badan kelinci

Gambar 2 memperlihatkan perubahan bobot badan kelinci selama 12 minggu penelitian. Semua kelinci terlihat mengalami kenaikan bobot badan. Kelompok kelinci yang diberi perlakuan "zinkofilin" cenderung memiliki bobot badan yang lebih besar daripada kelompok kontrol.



Gambar 2. Perubahan Bobot Badan Kelinci Kelompok Kontrol Positif (◆), Kontrol Negatif (■), Diberi "Zinkofilin" Dosis I (▲) dan Diberi "Zinkofilin" Dosis II (×)

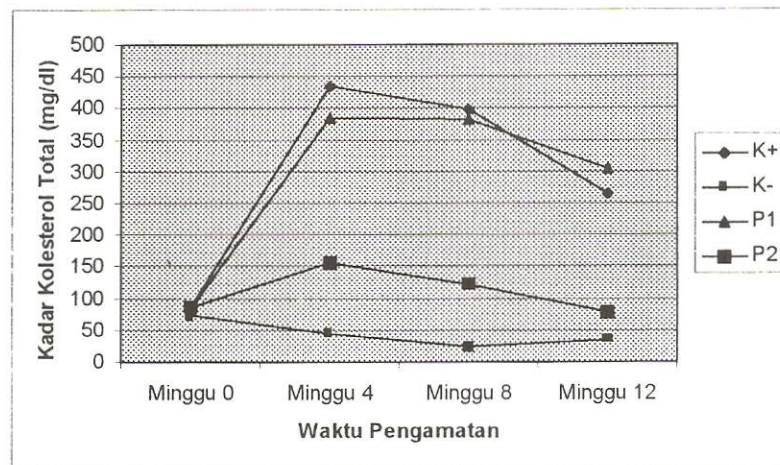
Kadar kolesterol total

Kadar kolesterol total serum darah semua kelinci pada awal penelitian berada pada batas normal, yaitu berkisar antara 71.8 – 87.2 mg/dl. Namun, setelah mendapatkan perlakuan selama 4 minggu, kadar kolesterol kelinci kelompok kontrol positif dan yang mendapat perlakuan “zinkofilin” terlihat meningkat. Kelinci kelompok kontrol dan yang mendapat “zinkofilin” dosis I mengalami hiperkoleseterolemia, sedangkan kadar koleseterol kelinci yang mendapat “zinkofilin” dosis II meningkat, tetapi tidak mengalami hiperkoleseterolemia. Pada minggu ke-8 dan 12, kadar kolesterol kelompok dosis II cenderung menurun untuk kembali ke batas normal, sedangkan kelompok kontrol dan dosis I tetap hiperkoleseterolemia (Gambar 3). Hal ini menunjukkan

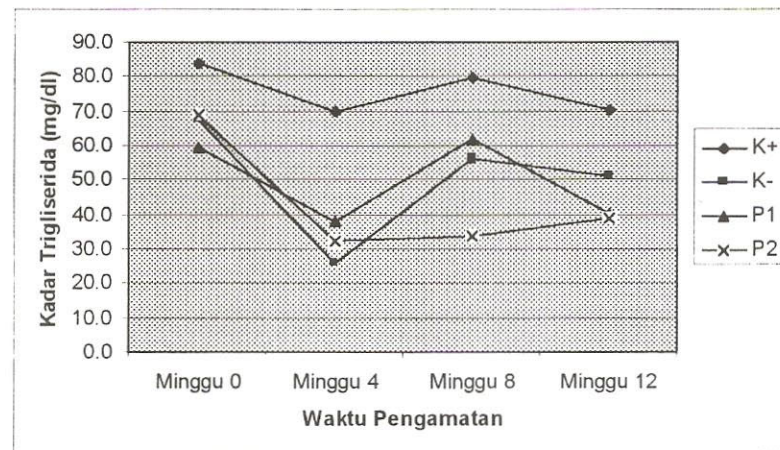
bahwa pemberian “zinkofilin” sebanyak 100.2 mg/ekor/hari dapat menekan kenaikan kadar kolesterol kelinci, bahkan dalam waktu yang lebih lama dapat menjaga kadar kolesterol kelinci untuk tetap berada pada batas normal.

Kadar trigliserida

Kadar trigliserida kelinci kelompok kontrol positif relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kelinci kelompok lainnya, baik pada minggu ke-0, 4, 8 maupun 12, meskipun masih berada pada selang normal. Meskipun tidak memperlihatkan pola naik turun, terlihat kecenderungan bahwa kadar trigliserida kelinci menurun pada akhir penelitian.



Gambar 3. Kadar Kolesterol Total Serum Darah Kelinci Kelompok Kontrol Positif (◆), Kontrol Negatif (■), Diberi “Zinkofilin” Dosis I (▲) dan Diberi “Zinkofilin” Dosis II (■)



Gambar 4. Kadar Trigliserida Serum Darah Kelinci Kelompok Kontrol Positif (◆), Kontrol Negatif (■), Diberi “Zinkofilin” Dosis I (▲) dan Diberi “Zinkofilin” Dosis II (×)

Kadar HDL kolesterol

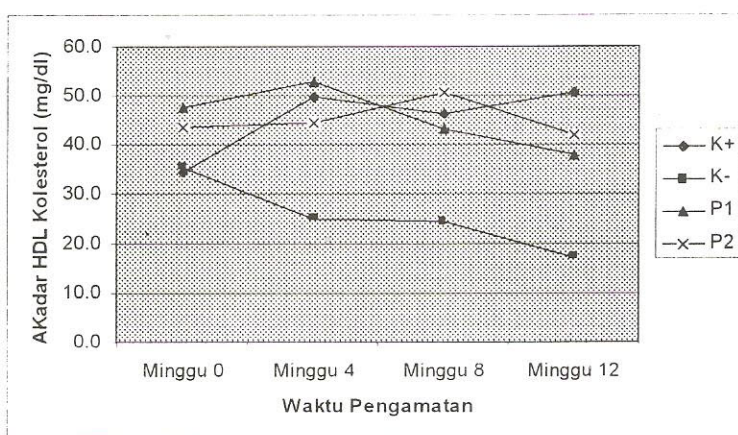
Pada Gambar 5 dapat dilihat bahwa kadar HDL kolesterol kelinci sebelum perlakuan berkisar antara 34.4-47.5 mg/dl. Namun, setelah perlakuan diberikan selama 12 minggu, terjadi perubahan kadar HDL kolesterol menjadi 17.2-50.8 mg/dl. Kelinci kelompok kontrol negatif cenderung mengalami penurunan kadar HDL koelsterol, sedangkan kelinci kelompok lainnya mempunyai kadar HDL yang relatif lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif.

Kadar LDL kolesterol

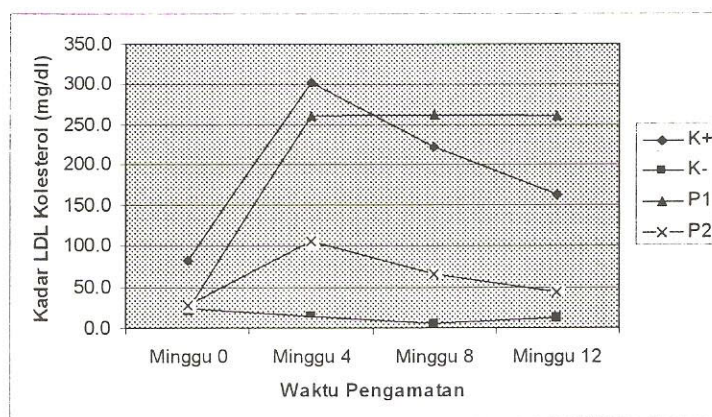
Rata-rata kadar LDL kolesterol kelinci sebelum perlakuan berkisar antara 22.7-82.3 mg/dl. Setelah diberi perlakuan selama 12 minggu, kadar kolesterol kelompok

kontrol positif dan kelompok dosis II cenderung lebih tinggi daripada kelompok kelinci lainnya. Kelinci kelompok dosis II "zinkofilin" memiliki kadar LDL kolesterol yang semakin rendah dan mendekati kadar LDL kelompok kontrol negatif dengan semakin lamanya waktu penelitian.

Secara umum dari hasil penelitian ini dapat dilihat bahwa pemberian "zinkofilin", khususnya dosis II, pada kelinci percobaan memberikan pengaruh yang positif, karena dapat mencegah kenaikan kadar kolesterol total, trigliserida, dan LDL kolesterol. Kadar kolesterol total, trigliserida dan LDL kolesterol yang tinggi merupakan penyebab terjadinya berbagai penyakit yang bersifat degeneratif, seperti penyakit jantung koroner. Oleh karena itu, "zinkofilin" mempunyai potensi dalam pencegahan penyakit degeneratif.



Gambar 5. Kadar HDL Kolesterol Serum Darah Kelinci Kelompok Kontrol Positif (◆), Kontrol Negatif (■), Diberi "Zinkofilin" Dosis I (▲) dan Diberi "Zinkofilin" Dosis II (×)



Gambar 6. Kadar LDL Kolesterol Serum Darah Kelinci Kelompok Kontrol Positif (◆), Kontrol Negatif (■), Diberi "Zinkofilin" Dosis I (▲) dan Diberi "Zinkofilin" Dosis II (×)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kompleks Zn-feofitin ("zinkofilin") dapat dibuat dengan menambahkan sejumlah ion Zn^{2+} pada feofitin. Penambahan ion Zn^{2+} sebanyak 200 ppm menghasilkan produk "zinkofilin" dengan karakteristik terbaik.

Pemberian "zinkofilin" sebanyak 100.2 mg/hari pada kelinci dapat mencegah peningkatan kadar kolesterol total dan LDL kolesterol serum darah kelinci.

Saran

Dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh "zinkofilin" terhadap keadaan histopatologis dan imunitas hewan percobaan.

DAFTAR PUSTAKA

- Breinholt, V., M. Schimerlik, R. Dashwood & G. Bailey. 1995. Mechanism of chlorophyllin anticarcinogenesis against aflatoxin B1 : complex formation with the carcinogen. *Chem. Research in Toxicol.* 8 (4) : 506-514.
- Hasegawa, R., M. Hirose, T. Kato, A. Hagiwara, P. Boonyaphiphat, M. Nagao, N. Ito & T. Shirai. 1995. Inhibitory effect of chlorophyllin on PhIP-induced mammary carcinogenesis in female F344 rats. *Carcinogenesis.* 16 (9) : 2243-2246.
- Karyadi, D. 1996. Peranan makanan kesehatan dalam mencegah penyakit degeneratif. Makalah pada Seminar Nuansa Pangan dan Gizi, HIMAGITA, GMSK, IPB. Bogor.
- Keller, P., M. Sowinsha, V. Tasetti, F. Heisel, A. Hajri, S. Evrard, J. Marescaux, & M. Aprahamian. 1996. Photodynamic imaging of a rat pancreatic cancer with pheophorbide a. *Photochem-Photobiol.* 63 (6) : 860-876.
- Tasetti, V., A. Hajri, M. Sowinsha, S. Evrard, F. Heisel, L.Q. Cheng, J.A. Miche, J. Marescaux, & N. Aprahamian. 1997. *In vivo laser-induced fluorescence imaging of a rat pancreatic cancer with pheophorbide a.* *Photochem-Photobiol.* 65 (6) : 997-1006.
- Okai, Y & K.H. Okai. 1997. Potent anti-inflammatory activity of pheophytin a derived edible green algae, *Enteromorpha prolifera* (Sujiro-nori). *Int. J. Immunopharmacol.* 19 (6) : 355-358.
- Nagishi, T., H. Rai & H. Hayatsu. 1997. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat-Res.* 376 (1-2) : 97-100.
- Vlad, M., E. Bordas, E. Caseanu, G. Uza, E. Creteanu, & C. Polinicenco. 1995. Effect of chlorophyllin on experimental atherosclerosis. *Biol. Trace Elem. Res.* 48 (1) : 99-109.
- von Elbe, J.H., A.S. Huang, E.L. Attoe, & W.K. Nank. 1986. Pigment composition and color of conventional and Veri-Green canned beans. *J. Agric. Food Chem.* 34 (1) : 52-54.
- Tonucci, L.H. & J.H. von Elbe. 1992. Kinetics of formation of zinc complexes of chlorophyll derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 40 (12) : 2341-2344.
- Mahmud, M. 1994. Pemurnian klorofil daun suji (*Pleomele angustifolia* N.E. Brown). Skripsi sarjana yang tidak dipublikasikan. Jurusan Kimia, FMIPA, IPB. Bogor