

**AKTIVITAS INHIBISI EKSTRAK DAUN SEMANGGI AIR (*Marsilea crenata*)
TERHADAP ENZIM HMG-KoA REDUKTASE**

**[INHIBITION ACTIVITIES OF WATER CLOVER (*Marsilea crenata*) LEAF EXTRACT
ON HMG-CoA REDUKASE ENZYME]**

Hardoko^{1,2}, Winny Livianti Gunawan², dan Ratna Handayani²

¹Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran No. 1 Malang

²Jurusan Teknologi Pangan, UPH, Jl. Thamrin Boulevard 0-0, Lippo Karawaci, Tangerang.

*Korespondensi penulis : hardoko.fti@uph.edu dan hardoko@ub.ac.id

ABSTRACT

*Water clover plants (*Marsilea crenata*) are often used as vegetables and traditional medicine for high blood pressure, and contain phytochemical compounds that have the potential to reduce cholesterol. The purpose of the study was to determine the potential of water clover leaves as a natural cholesterol-lowering ingredient through inhibition of HMG-KoA enzyme by water clover leaf extract. The research method used was the experimental method with the treatment of leaf conditions (fresh and dry) and a combination of solvent ethyl acetate - methanol (0: 100; 25:75; 50:50; 75:25; 100: 0). The extraction process is carried out by maceration swaying at room temperature. The results showed that dried leaf extract had a higher inhibitory activity of HMG-CoA reductase enzyme than wet leaf extract. Clover leaf extract with methanol solvent results in higher inhibition of HMG-CoA enzyme. The highest inhibitory extract was dried clover leaves extracted using a ratio of 100: 0 ethyl acetate-methanol and had an inhibition value of 95.12% and the same as pravastatin with an inhibition value of 93.06%. The extract contains phenolic phytochemicals, flavonoids, and steroids. The extract had the highest total flavonoids, namely 29.47 ± 0.30 mg QE / g extract. Thus water clover leaves are potentially as cholesterol-lowering natural ingredients.*

Keywords : extract, HMG-Co reductase, inhibition, water clover

ABSTRAK

Tanaman semanggi air (*Marsilea crenata*) sering dijadikan sayuran dan obat tradisional sakit darah tinggi, serta mengandung senyawa fitokimia yang berpotensi untuk menurunkan kolesterol. Tujuan dari penelitian adalah untuk mengetahui potensi daun semanggi air sebagai bahan alami penurun kolesterol melalui aktivitas penghambatan enzim HMG-KoA oleh ekstrak daun semanggi air. Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dengan perlakuan kondisi daun (segar dan kering) dan kombinasi pelarut etil asetat – metanol (0:100; 25:75; 50:50; 75:25; 100:0). Proses ekstraksi dilakukan secara maserasi bergoyang pada suhu ruang. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak daun kering mempunyai aktivitas penghambatan enzim HMG-KoA reduktase lebih tinggi dari pada ekstrak daun basah. Ekstrak daun semanggi dengan pelarut metanol menghasilkan inhibisi enzim HMG-KoA lebih tinggi. Ekstrak yang paling tinggi inhibisinya adalah daun semanggi air kering yang diekstrak menggunakan rasio pelarut etil asetat-metanol 100 :0 dan mempunyai nilai inhibisi mencapai 95,12% dan sama dengan obat pravastatin dengan nilai inhibisi 93,06%. Ekstrak tersebut mengandung fitokimia fenolik, flavonoid, dan steroid. Ekstrak tersebut memiliki total flavonoid paling tinggi yaitu 29.47 ± 0.30 mg QE/g extract. Dengan demikian daun semanggi air berpotensi sebagai bahan alami penurun kolesterol.

Kata kunci : ekstrak, HMG-KoA reduktase, inhibisi, semanggi air

PENDAHULUAN

Enzim 3-hidroksi-3-metilglutaril Koenzim A reduktase sering disingkat HMG-KoA reduktase merupakan jenis enzim yang bertindak sebagai pembatas (rate limiting) dalam sintesis kolesterol pada hewan dan manusia (Friesen dan Rodwell, 2004). Penghambatan aktivitas enzim HMG-KoA reduktase dari suatu senyawa mengindikasikan kemampuan senyawa tersebut dalam menurunkan kolesterol, sehingga enzim ini sering digunakan untuk mempelajari kemampuan suatu zat dalam menurunkan kolesterol. Penghambatan enzim HMG-KoA reduktase menghasilkan peningkatan sintesis reseptor LDL yang dapat menurunkan kolesterol dalam darah (Alpert dan Ewi, 2002).

Zat yang mampu menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase ada yang sintetis dan ada yang alami. Senyawa sintetis yang sering dijadikan obat penurun kolesterol adalah statin (*Hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor*). Lima jenis *HMG-CoA reductase inhibitors* yang tersedia saat ini adalah atorvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin, dan fluvastatin. Efek samping yang terjadi dari statin meliputi *dyspepsia, flatulus, constipatin, abdominal pain* dan *cramps*, dan keracunan pada hati (Alpert dan Ewi, 2002).

Adanya efek samping dari obat sintetis menyebabkan orang berpaling mencari bahan

alami yang mempunyai kemampuan menghambat enzim HMG-KoA reduktase. Bahan alami dianggap lebih aman daripada obat sintetis. Salah satu bahan alami yang berpotensi mampu menghambat enzim HMG-KoA reduktase adalah Semanggi air (*Marsilea crenata*). Semanggi air secara tradisional sering dijadikan obat, juga di beberapa daerah Jawa Timur dan Jawa Tengah sering dijadikan sayuran pada makanan tradisional yang disebut pecel. Situasi ini dapat digunakan untuk menjaga keamanan pangan di Indonesia (Irawan, 2003). Menurut Lichvar (2012) *Marsilea crenata* yang ditemukan oleh K. Presl merupakan spesies yang hampir selalu tumbuh di daerah basah (*wetlands*). *Marsilea crenata* memiliki nama umum *False Pepperwort*. Terdapat sebelas spesies lain yang telah diidentifikasi, yaitu *M. ancylopoda*, *M. hirsuta*, *M. macropoda*, *M. minuta*, *M. molis*, *M. mutica*, *M. oligospora*, *M. polycarpa*, *M. quadrifolia*, *M. vestita*, dan *M. villosa*.

Semanggi air memiliki peran penting dalam penelitian obat yang dihasilkan dari tumbuh-tumbuhan. Hasil pengujian fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak metanol semanggi air mengandung alkaloid, flavonoid, karbohidrat, gula pereduksi dan asam amino (Kristiono, 2009). Komponen steroid juga terdeteksi pada ekstrak kasar kloroform dan etil asetat semanggi air *M.*

minuta (Nurjanah *et al.*, 2012). Ekstrak kasar dari *M. minuta* menunjukkan kandungan komponen bioaktif terbanyak dalam pelarut kloroform dan petroleum eter (Mithraja, 2011). Senyawa fitokimia tersebut berpotensi dalam menghambat enzim HMG-KoA reduktase. Beberapa penelitian menyatakan bahwa senyawa fitokimia antioksidan dapat mencegah penyakit yang berhubungan dengan kolesterol (Xu dan Howard, 2012).

Pada tahun 2005, penyakit kardiovaskular menyebabkan angka kematian sebesar 18 juta di dunia. Penurunan total level kolesterol dalam darah merupakan strategi yang baik untuk mengurangi penyakit kardiovaskular (Roth *et al.*, 2010). Strategi ini dapat dilakukan dengan bahan alami, diantaranya dengan semanggi air. Hal ini didasarkan pada laporan Gupta *et al.* (2000) bahwa ekstrak metanol yang dipartisi menggunakan CHCl_3 :MeOH (1:1) dari *M. minuta* mampu menurunkan serum kolesterol, fosfolipid, dan trigliserida tikus hiperkolesterolemik.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan kondisi daun dan kombinasi pelarut yang digunakan untuk mengekstrak semanggi air jenis *Marsilea crenata* sehingga diperoleh ekstrak yang mempunyai aktivitas penghambatan enzim HMG-KoA reduktase terbaik. Ekstrak yang terbaik berpotensi sebagai obat atau makanan alami penurun kolesterol.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun semanggi air jenis *Marsilea crenata* yang diperoleh dari sawah di desa Golokan, Kecamatan Sidayu, Kabupaten Gresik, Jawa Timur. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah etil asetat dan metanol (Merck). Bahan yang digunakan untuk analisis adalah enzim HMG-KoA reduktase (Sigma), kalium fosfat-buffer (pH 7) (Sigma), air demineralisasi, NADPH (Sigma), HMG-KoA (Sigma), pravastatin (Sigma), etanol 80%, etanol 95%, AlCl_3 10%, CH_3COOK 1M, standar quercetin, reagen Folin-Ciocalteu (Merck), Na_2CO_3 , dan standar asam galat.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven merek *Heraeus*, *freezer*, dan *blender*. Alat-alat yang digunakan untuk ekstraksi adalah *rotary evaporator* merek *Buchi re 111 rotavapor*, *UV-Vis double beam spectrophotometer*, neraca analitik, *vortex*, gelas ukur, pipet volumetrik, erlenmeyer, kertas saring Whatman #43, dan labu bulat. Alat-alat yang digunakan untuk analisis adalah *waterbath*, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet volumetrik, *microtube*, mikropipet (2-20 μ l; 20-200 μ l, 200-1000 μ l), *tip*, kuvet *semi-micro disposable*.

Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan perlakuan kombinasi

pelarut etil asetat : metanol (0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0) dan perlakuan kondisi daun (segar dan kering).

Proses Pembuatan Ekstrak

Daun semanggi segar dicuci dan ditiriskan. Sebagian daun dipotong kecil-kecil dan diblender, sebagian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 6 jam, kemudian dihancurkan menggunakan *dry blender* selama 2 menit sampai 5 menit. Hancuran daun segar dan daun yang telah dikeringkan ditambah pelarut dengan rasio sampel : pelarut adalah 1:20. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan *shaker* pada suhu ruang selama 24 jam. Larutan disaring menggunakan kertas Whatman #43 lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dan tekanan 0.3 atm, sehingga diperoleh ekstrak daun segar dan ekstrak daun kering yang siap untuk dianalisis.

Ekstrak diuji aktivitas penghambatannya terhadap aktivitas enzim HMG-KoA reduktase (Sigma-Aldrich, 2007; (Shafazila dan Hung, 2011), rendemen ekstrak, fitokimia (Dwitaharyani, 2012; Tarnam dan Begum, 2013; Ogbonia *et al.*, 2008; Nurjanah *et al.*, 2011), total fenolik (Tangkanakul *et al.*, 2009), dan total flavonoid (Chang *et al.*, 2002).

Analisis Inhibisi Enzim HMG-KoA Reduktase (Sigma Aldrich, 2007)

Uji aktivitas HMG-KoA reduktase dilakukan dengan metode spektrofotometri. Prinsip kerja dari uji ini adalah pengukuran penurunan absorbansi NADPH pada panjang gelombang 340 nm, yang disebabkan oleh oksidasi NADPH oleh enzim HMG-KoA reduktase dengan adanya substrat HMG-KoA. Sistem reaksi enzim yaitu 2 µl sampel + 362 µl buffer + 8 µl NADPH + 24 µl HMG-KoA + 4 µl HMGR, dikocok menggunakan *vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Juga dibuat blanko tanpa ekstrak dan HMGR dan dibuat kontrol tanpa ekstrak dengan sistem reaksi yang sama. Sistem reaksi larutan dibaca pada panjang gelombang 340 nm. Inhibisi (%) dihitung dengan rumus: $[(C-S) / C] \times 100\%$, dimana C = absorbansi kontrol tanpa sampel, dan S = Absorbansi sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak

Rendemen ekstrak dihitung dengan cara membandingkan berat ekstrak dan berat daun semanggi sebelum ekstraksi. Uji statistik *Two way ANOVA* menunjukkan bahwa kombinasi pelarut, kondisi daun, dan interaksi kedua perlakuan berpengaruh nyata ($p < 0.05$) terhadap rendemen ekstrak. Hasil uji lanjut Duncan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak daun semanggi air

Pelarut (EtOAc:MeOH)	Rendemen (%)	
	Daun Segar	Daun Kering
0:100	19.83±2.81 ^c	19.29±0.89 ^{bc}
25:75	21.83±2.04 ^c	14.19±3.01 ^a
50:50	21.10±1.14 ^c	13.16±2.11 ^a
75:25	20.17±0.80 ^c	13.46±1.40 ^a
100:0	16.26±1.22 ^{ab}	13.95±1.48 ^a

Keterangan: Notasi huruf superscript pada satu kolom menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Tabel 1. menunjukkan bahwa ekstrak daun segar metanol 100% tidak memiliki perbedaan rendemen yang nyata ($p > 0.05$) dengan ekstrak-ekstrak daun segar lainnya, kecuali ekstrak etil asetat 100%. Ekstrak daun segar etil asetat 25%: metanol 75% memiliki rendemen yang berbeda nyata dengan ekstrak ekstrak daun segar dan daun kering etil asetat 100%, ekstrak daun kering etil asetat 25% : metanol 75%, ekstrak etil asetat 50% : metanol 50%, dan ekstrak daun kering etil asetat 75% : metanol 25%.

Ekstrak daun segar lebih encer dari daun kering karena masih mengandung air yang tidak sepenuhnya menguap saat proses pemekatan oleh *rotary evaporator*. Ekstrak daun kering memiliki tekstur pekat karena sebagian besar air telah dihilangkan dalam proses pengeringan. Rata-rata kadar air ekstrak daun segar sebesar 85.08% dan ekstrak daun kering sebesar 47.74%. Rata-rata kadar abu ekstrak daun segar sebesar 2.22% dan ekstrak daun kering sebesar 7.67%. Kadar air ekstrak daun segar lebih tinggi dari pada ekstrak daun kering,

sedangkan kadar abunya lebih rendah dari pada ekstrak daun kering.

Fitokimia Ekstrak

Uji senyawa fitokimia secara kualitatif yang dilakukan meliputi uji tanin, alkaloid, fenolik, flavonoid, steroid dan terpenoid. Hasil uji fitokimia ekstrak daun semanggi air dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji fitokimia ekstrak daun semanggi air

Sampel Daun	Et-AC : MetOH	Senyawa fitokimia					
		Tanin	Alkaloid	Fenolik	Flavonoid	Steroid	Terpenoid
Segar	0:100	+	-	+	+	-	+
	25:75	+	-	+	+	-	+
	50:50	+	-	+	+	-	+
	75:25	+	-	+	+	-	+
	100:0	-	-	+	+	+	-
Kering	0:100	+	-	+	+	-	+
	25:75	+	-	+	+	-	+
	50:50	+	-	+	+	-	+
	75:25	-	-	+	+	-	+
	100:0	-	-	+	+	+	-

Keterangan: + senyawa fitokimia terdeteksi
 - senyawa fitokimia tidak terdeteksi

Senyawa tanin terdapat pada semua ekstrak kecuali ekstrak etil asetat 100% daun kering dan daun segar. Warna ekstrak etil asetat daun kering dan segar tidak berubah menjadi biru kehijauan yang menandakan tidak adanya kandungan tanin. Tanin merupakan senyawa polar yang secara konvensional diekstrak menggunakan air pada suhu 40 sampai dengan 90°C (Capparucci *et al.*, 2011).

Tanin memiliki kelarutan yang baik dalam senyawa polar, sedangkan etil asetat merupakan senyawa semipolar. Metanol merupakan senyawa polar yang kuat sehingga dapat mengekstrak tanin. Mithraja *et al.*, (2011) menyatakan bahwa tanin

terdeteksi pada ekstrak aseton, benzene, kloroform, air, dan petroleum eter dari *Marsilea minuta*.

Senyawa alkaloid tidak terdapat pada semua jenis ekstrak. Semua ekstrak tidak membentuk endapan putih dan coklat dengan pereaksi Meyer dan Bouchardat, secara berurutan. Hal ini sesuai dengan Mithraja *et al.*, (2011), dimana semua ekstrak *Marsilea minuta* tidak mengandung alkaloid. Senyawa fenolik dan flavonoid terdapat pada semua jenis ekstrak. Penelitian Mithraja *et al.*, (2011) menyatakan bahwa semua ekstrak *Marsilea minuta* mengandung senyawa fenolik. Senyawa flavonoid terdapat pada ekstrak heksana, etil asetat, dan metanol dari *Marsilea crenata* (Nurjanah *et al.*, 2012). Fenolik merupakan golongan senyawa fitokimia terbesar dalam tumbuhan. Flavonoid termasuk dalam golongan fenolik.

Senyawa steroid terdapat pada ekstrak etil asetat 100% daun kering dan daun segar. Senyawa terpenoid terdapat pada semua jenis ekstrak kecuali ekstrak etil asetat 100% daun kering dan daun segar. Steroid merupakan subkelas dari terpena, yaitu golongan triterpena. Ekstrak yang direaksikan dengan pereaksi *Liebermann Burchad* berubah warna menjadi merah menunjukkan adanya kandungan terpenoid, sedangkan warna biru menunjukkan adanya kandungan steroid. Ekstrak etil asetat dari tanaman *Plectranthus glandulosus*

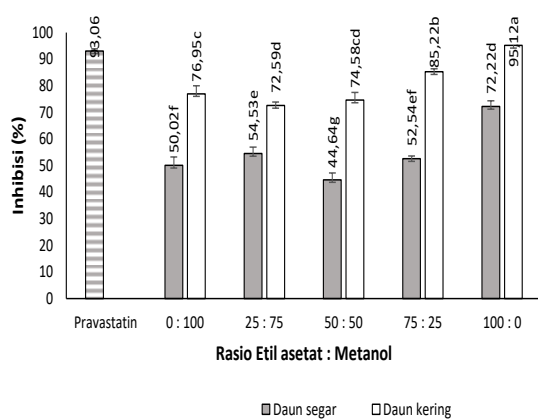
mengandung steroid dan flavonoid. Steroid cenderung larut dalam pelarut semi polar dibandingkan dengan polar (Egwaikhide dan Gimba, 2007). Menurut Nurjanah *et al.* (2012), steroid terdapat pada ekstrak etil asetat dan kloroform, namun tidak terdapat dalam ekstrak metanol.

Aktivitas Inhibisi Ekstrak terhadap Enzim

Persen inhibisi menunjukkan persen penghambatan ekstrak daun semanggi air terhadap enzim HMG-KoA reduktase. Semakin tinggi persen inhibisi ekstrak maka semakin besar aktivitas penghambatan ekstrak. Aktivitas penghambatan ekstrak dapat dibandingkan dengan obat pravastatin untuk mengetahui potensi ekstrak daun semanggi sebagai penurun koleterol. Pravastatin merupakan senyawa turunan statin yang telah digunakan secara luas sebagai obat antikolesterol. Senyawa ini bekerja dengan menghambat aktivitas enzim HMG-KoA reduktase. Hasil uji lanjut Duncan dapat dilihat pada Gambar 1.

Secara umum Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak daun semanggi kering mempunyai aktivitas inhibisi lebih besar daripada ekstrak daun semanggi kering. Hal ini diduga terkait dengan kemampuan pelarut untuk masuk kedalam pori-pori sel lebih mudah dan kurang terhalangi oleh adanya air dalam bahan sehingga mampu mengekstrak senyawa lebih banyak. Hal ini senada dengan pernyataan Brenan *et al* (1990) bahwa

kemampuan pelarut dalam mengekstrak ditentukan oleh kemampuan pelarut tersebut masuk kedalam sel atau jaringan yang diekstrak. Fenomena aktivitas penghambatan ekstrak daun kering yang lebih besar daripada daun segar juga mengindikasikan bahwa proses pengeringan yang dilakukan tidak mempengaruhi aktivitas senyawa aktifnya.



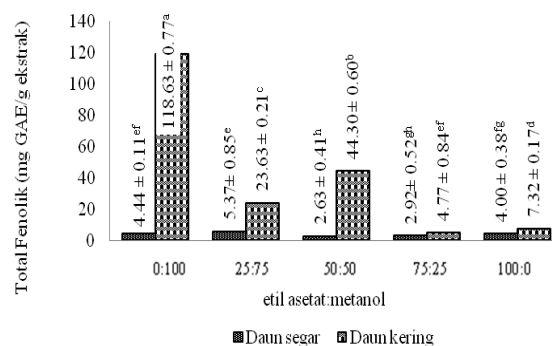
Keterangan: huruf dibelakang angka menunjukkan beda nyata pada $p < 0.05$

Gambar 1. Inhibisi ekstrak daun semanggi terhadap enzim HMG-KoA.

Gambar 1 menunjukkan bahwa ekstrak daun kering dengan pelarut etil asetat 100% tidak memiliki perbedaan persen inhibisi yang paling tinggi. Hal ini barangkali terkait dengan senyawa fitokimia pada Tabel 4 menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat 100% mengandung senyawa fenolik, flavonoid, dan steroid. Terkait dengan aktivitas senyawa fitokimia tersebut, Ranti *et al.*, (2013) melaporkan bahwa ekstrak flavonoid menurunkan level kolesterol pada tikus sebesar 86.45% dan ekstrak steroid menurunkan level kolesterol sebesar 72.53%.

Apabila ekstrak daun semanggi dibandingkan dengan obat provastatin terlihat bahwa ekstrak etil asetat 100% daun semanggi kering mempunyai kemampuan sama dengan obat provastatin. Hal ini mirip dengan laporan Ratnawati dan Widowati (2011) menyatakan bahwa fraksi etil asetat dari kacang velvet memiliki aktivitas antikolesterol lebih baik dibandingkan dengan simvastatin (obat kolesterol) dan vitamin E pada tikus yang memiliki kadar kolesterol tinggi. Kandungan senyawa flavonoid yang tinggi dalam kacang velvet diduga berperan sebagai senyawa antikolesterol.

Total Fenolik dan Total Flavonoid

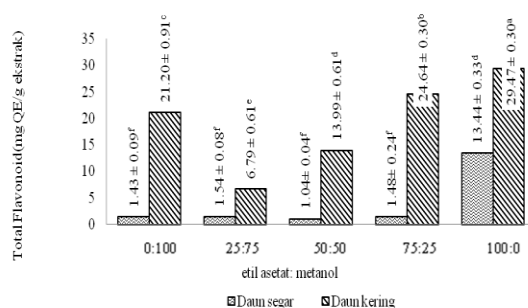


Keterangan: huruf dibelakang angka menunjukkan beda nyata ($p < 0.05$)

Gambar 2. Total fenolik ekstrak daun semanggi air.

Gambar 2 menunjukkan bahwa ekstrak metanol 100% berbeda nyata dengan ekstrak-ekstrak lainnya. Ekstrak metanol 100% memiliki kandungan total fenolik tertinggi diantara ekstrak-ekstrak lainnya. Penelitian Hossain *et al.*, (2011) menyatakan bahwa

kandungan total fenolik tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol daun *Tetrastigma* dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Ekstrak metanol kulit buah *pomegranate* memiliki kandungan fenolik paling tinggi diantara pelarut-pelarut lainnya (air, etanol, etil asetat, dan aseton) (Wang *et al.*, 2011). Menurut Sarker, *et al.* (2006), ekstraksi total menggunakan pelarut polar untuk mengekstrak sebanyak mungkin komponen yang ada. Metanol merupakan pelarut polar sehingga dapat mengekstrak senyawa fenolik lebih banyak dibandingkan dengan etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut semipolar sehingga lebih selektif untuk ekstraksi senyawa semipolar.



Keterangan: huruf dibelakang angka menunjukkan beda nyata (p<0.05)

Gambar 3. Total flavonoid ekstrak daun semanggi air

Apabila dihubungkan dengan aktivitas inhibisi (Gambar 1) ada kecenderungan semakin tinggi total fenolik, maka semakin rendah aktivitas penghambatan enzim HMG-KoA. Senyawa fenolik dibagi ke dalam empat kelompok utama, yaitu asam fenolat dan turunannya, flavonoid, lignan dan

stilbene (Frank, 2004). Hal ini menunjukkan bahwa tidak semua komponen fenolik yang terekstrak berperan dalam penghambatan enzim HMG-KoA reduktase.

Gambar 3 menunjukkan bahwa ekstrak daun kering memiliki total flavonoid yang berbeda nyata (p<0.05) dengan dengan ekstrak daun segar. Hal ini dapat disebabkan kadar air ekstrak daun kering yang lebih rendah dari pada daun segar Penelitian Shahid (2012) menyatakan bahwa ekstraksi senyawa fitokimia secara optimal diperoleh dari bubuk daun. Ekstrak daun kering etil asetat 100% berbeda nyata (p<0.05) dengan ekstrak-ekstrak lainnya. Ekstrak daun kering dengan pelarut etil asetat 100% memiliki kandungan total flavonoid yang berbeda nyata (p<0.05) dengan ekstrak-ekstrak lainnya. Ekstrak daun kering dengan pelarut etil asetat 100% memiliki total flavonoid tertinggi di antara lainnya. Etil asetat merupakan pelarut semipolar, sedangkan metanol merupakan pelarut polar. Kombinasi antara etil asetat dan metanol terbukti tidak meningkatkan total flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa semipolar. Menurut Sarker *et al.*, (2006), sampel diekstrak menggunakan pelarut dengan kepolaran yang sesuai mengikuti prinsip “like dissolves like”.

Kemampuan etil asetat dalam mengekstrak senyawa flavonoid dari daun semanggi air lebih besar dari metanol dan kombinasi keduanya. Hasil ini didukung oleh

penelitian Madaan *et al.*, (2011) yang menyatakan bahwa kandungan total flavonoid pada fraksi etil asetat akar *Actaea spicata* lebih besar dari pada ekstrak metanol. Ekstrak etil asetat dari buah *Morinda citrifolia* menghasilkan total flavonoid tertinggi (Ramamoorthy dan Bono, 2007).

total flavonoid berkorelasi negatif terhadap aktivitas enzim. Hal ini menunjukkan bahwa total flavonoid daun segar berkorelasi positif dengan aktivitas hipokolesterolemik, yaitu semakin tinggi total flavonoid, maka semakin tinggi aktivitas hipokolesterolemik.

Ekstrak etil asetat *Marsilea crenata* memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (70.19 mg/L) dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan etanol dari tumbuhan paku lainnya (Pradyasub dan Pimsamarn, 2011). Aktivitas antioksidan dari ekstrak etil asetat diduga karena adanya senyawa flavonoid. *Morelloflavone* yang diisolasi dari daun *Garcinia dulcis* bekerja sebagai inhibitor HMG-KoA reduktase yang efektif pada tikus hiperkolesterolemia (Tuansulong, 2009). Menurut Lee *et al.* (2003), efek hipokolesterolemik tampak pada hewan yang diberi teh (naringenin dan naringenin 7-O-*cetylether*). Suplementasi hesperidin menurunkan level kolesterol darah pada tikus yang diberi makanan tinggi kolesterol (1%). Penurunan level kolesterol darah terjadi bersamaan dengan penurunan aktivitas HMG-KoA reduktase (Park *et al.*, 2001).

Komponen Senyawa Ekstrak Etil asetat

Tabel 3. Senyawa bioaktif pada ekstrak etil asetat 100% yang diduga memiliki aktivitas hipokolesterolemik

Retention Time (menit)	Luas Area(%)	Senyawa
6.40	11.39	Toluena
7.07	7.43	Etilbenzena
7.13	5.53	1,4-dimetilbenzena
7.36	12.80	Sikloheksanon
15.34	5.44	<i>Neophytadiene</i>
21.83	6.65	1,2- <i>benzenedicarboxylic acid</i>
8.57	0.85	<i>dl-Limonene</i>
8.63	0.28	1,8- <i>cineole</i>
12.41	0.66	Asam oleat
12.99	0.26	2,4-di- <i>tert-butylphenol</i>
17.39	2.55	<i>Phytol isomer</i>

Identifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak etil asetat 100% dilakukan menggunakan metode GC-MS. Secara kualitatif, ekstrak etil asetat 100% mengandung senyawa flavonoid dan steroid, namun flavonoid merupakan senyawa non volatil sehingga tidak terdeteksi. Berdasarkan Tabel 6 dapat diketahui beberapa senyawa biaktif yang teridentifikasi dari ekstrak daun semanggi air (*Marsilea crenata*). Beberapa senyawa yang teridentifikasi merupakan golongan terpenoid, namun hasil uji fitokimia senyawa terpenoid tidak teridentifikasi pada ekstrak etil asetat. Hal ini dapat disebabkan oleh rendahnya konsentrasi terpenoid.

Neophytadiene merupakan inhibitor enzim farnesil transferase yang berhubungan dengan penghambatan sel kanker. Senyawa ini ditemukan pada ekstrak etanol dari

tumbuhan herbal *Coriandrum sativum* L. (Kanimozhi dan Bai, 2012). Di-Limonene merupakan senyawa golongan monoterpen yang biasanya ditemukan dalam jumlah besar pada minyak kulit buah *citrus*. Limonene juga terdapat pada daun seledri dan *cardamom*. Senyawa ini dapat menghambat aktivitas HMG-KoA reduktase (Pattanayak *et al.*, 2009). 1,8-cineole atau *eucalyptol* merupakan monoterpen oksida yang dihasilkan oleh pohon *eucalyptus* dan beberapa sumber lainnya seperti daun salam dan basil. Senyawa ini menunjukkan aktivitas antioksidan dan antiinflamatori pada zebrafish tinggi kolesterol (Kyung-Hyun, 2012).

Phytol merupakan senyawa diterpen alkohol yang menjadi prekursor dalam pembuatan vitamin E dan vitamin K sintetik. Phytol memiliki aktivitas antioksidan melalui pencegahan peroksidasi lipid (Santos *et al.*, 2013). Asam oleat merupakan asam lemak rantai panjang (18:1) yang memiliki aktivitas antioksidan dan antiinflamatori (Chouhan *et al.*, 2011). 2,4-di-*tert-butylphenol* atau yang dikenal dengan nama Prodox 146 bekerja sebagai antioksidan dengan menghambat oksidasi LDL yang memiliki peran penting dalam pencegahan penyakit aterosklerosis (Mi-Ae *et al.*, 2006).

KESIMPULAN

Ekstrak etil asetat 100% daun semanggi air *M. crenata* kering memiliki aktivitas aktivitas penghambatan enzim HMG-KoA reduktase paling tinggi dan sama dengan obat pravastatin, sehingga berpotensi sebagai bahan alami penurun kolesterol.

Estrak daun kering semanggi air mengandung senyawa fitokimia fenolik, flavonoid, dan steroid. Ekstrak tersebut memiliki total flavonoid paling tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Alpert, J.S. and G.A. Ewy. 2002. Manual of Cardiovascular Diagnosis and Therapy, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Brennan, J.G., J.R. Butters, N.D. Cowell and A.E.V. Lilley. 1990. Food Engineering Operation. London : Elsilever Science Publ. Ltd.
- Capparuci, C., Gironi, F., and Piemonte, V. 2011. Tannins extraction from walnuts residues. Department of Chemical Engineering Materials & Environment University of Rome "La Sapienza", pp 6.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colometric methods. Journal of Food and Drug Analysis, 10 (3) : 178-182.
- Chouhan, H.S., Sahu, A.N., and Singh, S.K. 2011. Fatty acid composition, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities of aeed oil from *Crotalaria juncea* Linn. Journal of Medicinal Plants Research 5(6): 984-991.

- Dwitaharyani, M. 2012. Nanopropolis sebagai penghambat proliferasi sel kanker payudara MCF-7. Bogor : Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Egwaikhide, P.A. and Gimba, C.E. 2007. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant. Middle-East Journal of Scientific Research. 2(3-4): 135-138.
- Frank, J. 2004. Dietary phenolic compounds and vitamin E bioavailability. Swedish University of Agricultural Science. Dissertation.
- Friesen, J.A. and V.W. Rodwell. 2004. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. Genome Biology (5):248.
- Gupta, R.S., Kumar, P., Sharma, A., Bharadwaj, T.N., and Dixit, V.P. 2000. Hypocholesterolemic activity of *Marsilea minuta* in gerbils." Fitoterapia 71 : 113-117.
- Hossain, M.A., Shah, M.D., Gnanaraj, C.. and Iqbal, M. 2011. *In vitro* total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2011 : 717-721.
- Irawan, D. 2003. Ethnobotanical study and the nutritional values of selected Indonesian auxiliary vegetables. Bogor: Institut Pertanian Bogor. Thesis.
- Kanimozhi, D and Bai, R. 2012. Analysis of bioactive components of ethanolic extract of *Coriandrum sativum* L. International Journal of Research in Pharmacy and Science 2(3), 97-110.
- Kristiono, S.S. 2009. Analisis mikroskopis dan fitokimia semanggi air *Marsilea crenata* Presl (*Marsileaceae*). Bogor : Institut Pertanian Bogor. Skripsi.
- Kyun-Hyun, C. 2012. 1,8-Cineole protected human lipoproteins from modification by oxidation and glycation and exhibited serum lipid-lowering and anti-inflammatory activity in Zebrafish. The Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology Report :565-570.
- Lee, M.K., Moon, S.S., Lee, S.E., Bok, S.H., Jeong, T.S., Park, Y.B., and Choi, M.S. 2003. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. Bioorganic and Medicinal Chemistry 11: 393-398.
- Lichvar, R.W. 2012. The National Wetland Plant List. Washington: US Army Corps of Engineers.
- Mi-Ae, Y., Tae-Sook, J., Doo-Sang, P., Ming-Zhe, X., Hyun-Woo, O., Kyoung-Bin, S., Woo-Song, L., Ho-Yong, P. 2006. Antioxidant effect of quinoline alkaloids and 2,4-Di-*tert*-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. Pharmaceutical Society of Japan 29(4) : 735-739.
- Mithraja, M.J., Antonisamy, J.M., Mahesh, M., Paul, Z.M., and Jeeva, S. 2011. Phytochemical studies on *Azolla pinnata* R. Br., *Marsilea minuta* L., and *Salvinia molesta* Mitch. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2011: S26-S29.
- Nurjanah, Azka, A., dan Abdullah, A. 2012. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif semanggi air (*Marsilea*

- Crenata*). Jurnal Inovasi dan Kewirausahaan 1: 152-158.
- Nurjanah, Izzati, L dan Abdullah, A. 2011. Aktivitas antioksidan dan komponen bioaktif kerang pisau (*Solen spp*). Ilmu Kelautan 1 (3): 119-124.
- Ogbonia, S.O., Enwuru, N.V., Onyemenem, E.U., Oyedele, G.A., and Enwuru, C.A. 2008. Phytochemical evaluation and antibacterial profile of *Treculia africana* decne bark extract on gastrointestinal bacterial pathogens. African Journal of Biotechnology 7 (10):1385-1389.
- Park, Y.B., Do, K.M., Bok, S.H., and Lee, M.K., Jeong, T.S., dan Choi, M.S. 2001. Interactive effect of hesperidin and vitamin E supplements on cholesterol metabolism in high cholesterol-fed rats. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 71(1): 36-44.
- Pattanayak, M., Seth, P.K., Smita, S., and Gupta, S.K. 2009. Geraniol and Limonene Interaction with 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (*HMG-CoA Reductase*) for their Role as Cancer Chemo-preventive Agents. Journal Proteomics and Bioinformatics 2(11): 466-474.
- Pradyadsub, N. and Pimsamarn, J. 2011. The antioxidant activity of selected ferns. TIChE International Conference : 1-5.
- Ramamoorthy, P.K. and Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda Citrifolia* fruit extract from various extraction processes. Journal of Engineering Science and Technology. 2(1): 70-80.
- Ranti, G.C., Fatimawali, dan Wehantouw, F. 2013. Uji efektivitas ekstrak flavonoid dan steroid dari gedi (*Abelmoschus Manihot*) sebagai anti obesitas dan hipolipidemik pada tikus putih jantan galur wistar. Jurnal Ilmiah Farmasi 2(2): 34-39.
- Ratnawati, H. and Widowati, W. 2011. Anticholesterol activity of velvet bean (*Mucuna pruriens L.*) towards hypercholesterolemic rats. Sains Malaysiana 40(4) : 317-321.
- Roth, G.A., Fihn, S.D., Mokdad, A.H., Aekplakorn, W., Hasegawa, T., and Lim, S.S. 2013. High total serum cholesterol, medication coverage and therapeutic control: analysis of national health examination survey data from eight countries. Bulletin of World Health Organization. Available from <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/2/10-079947/en/>; Internet accessed 23 April 2013.
- Santos, C.C.M.P, Salvadori, M.S., Mota, V.G., Costa,L.M., Almeida,A.A.C., Oliveira, G.A.L., Costa, J.P., Sousa, D.P., Freitas, R.M., and Almeida, R.N. 2013. Antinociceptive and antioxidant activities of phytol *In Vivo* and *In Vitro* models. Neuroscience Journal 2013 : 1-9.
- Sarker, S.D., Latif, Z., and Gray, A.I. 2006. Natural Products Isolation. New Jersey: Humana Press Inc.
- Shafazila, T.S., Pat, L.M., and Hung, L.K. 2011. Inhibition of lipid peroxidation by extract and fractions of *Dendrobium Sonia* 'red bom' International Conference on Biotechnology and Food Science. 7: 19-22.
- Shahid, A.A. 2012. Biological activities of extracts and isolated compounds from *Bauhinia galpinii* (fabaceae) and *Combretum vendae* (combretaceae) as potential antidiarrhoeal agents.

- Pretoria : University of Pretoria. Dissertation.
- Sigma-Aldrich. 2007. HMG-CoA reductase (HMGR) assay kit. BioFiles 2007, 2.7.2. Home page on-line. Available from <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/cs1090bul.Par.0001.File.tmp/cs1090bul.pdf>; Internet; accessed 15 April 2013.
- Tarnam, Y.A. and Begum, T.N. 2013 Preliminary phytochemical screening of four medicinal plants used for the treatment of diabetes. *International Journal of Research and Biomedical Sciences* 4 (4): 1272-1275.
- Tangkanakul, P., Auttaviboonkul, P., Niyomwit, B., and Lowviton, N. 2009. Antioxidant capacity, total phenolic content and nutritional composition of Asian foods after thermal processing. *International Food Research Journal* 16 : 571-580.
- Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., and Oreopoulou, V. 2007. Characterization of flavonoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules* 12 : 593-606.
- Tuansulong, K.A. 2009. Effect of morelloflavone on HMG-CoA reductase activity. Prince of Songkla University. Thesis.
- Wang, Z., Pan, Z., Ma, H., and Atungulu, G.G. 2011. Extract of phenolics from pomegranate peels. *The Open Food Science Journal* 5: 17-2.
- Xu, Z. and L.R. Howard. 2012. *Analysis of Antioxidant-Rich Phytochemicals*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.