

IN VIVO STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS ROLE ON ANTIHYPERCHOLESTEROL ACTIVITY OF VIRGIN COCONUT OIL

Studi In Vivo Peranan Senyawa Fenolik Dalam Aktivitas Antihiperkolesterol Virgin Coconut Oil

Tri Joko Raharjo*, Ariyani Setyo Widhiyati, Endah Mulya Asih, Sumiaty, Raden Tambunan, and Ani Setyopratiwi

Department of Chemistry Gadjah Mada University, Sekip Utara Yogyakarta 55281

Received 30 July 2007; Accepted 24 August 2007

ABSTRACT

The role of phenolic compounds on antihypercholesterol activity of Virgin Coconut Oil (VCO) has been investigated. The *in vivo* studies were carried out by treatment of two groups of Wistar white mouse (*Ratus norvegicus*) using high phenolic VCO and low phenolic VCO respectively, followed by analysis of lipid profile in blood and liver serum of the mouse. In addition a group of hypercholesterol mouse was treated with low phenolic VCO and the blood serum lipid profile was compared with untreated hypercholesterol mouse. The results show that phenolic compound play an important role on antihypercholesterol of VCO. Group of mouse treated with high phenolic VCO have better lipid profile (blood serum: total cholesterol: 70 mg/dL, triglyceride: 76 mg/dL, HDL: 20 mg/dL, LDL: 35 mg/dL; liver serum: total cholesterol: 7 mg/dL, triglyceride: 19 mg/dL) compared with the group treated with low phenolic VCO (blood serum: total cholesterol: 82 mg/dL, triglyceride: 100 mg/dL, HDL: 21 mg/dL, LDL: 41 mg/dL; liver serum: total cholesterol: 9 mg/dL, triglyceride: 34 mg/dL). Hypercholesterol mouse tests shown that low phenolic VCO treatment result in decreasing of blood serum cholesterol level by 52.10% which was not significantly different compared to untreated mice (decreasing of blood serum cholesterol level by 48.61%).

Keywords: antihypercholesterol, phenolic compound, VCO, *in vivo*

PENDAHULUAN

Virgin Coconut Oil (VCO) merupakan minyak yang berasal dari buah kelapa (*Coconus nucifera*) yang diolah pada suhu rendah dengan tanpa adanya proses pemanasan dan penambahan bahan kimia [1], sehingga menghasilkan VCO yang mengandung asam laurat yang cukup tinggi. Asam laurat adalah asam lemak jenuh yang berantai sedang atau biasa disebut dengan *medium chain fatty acid* (MCFA) yang mudah dimetabolisme dan bersifat antimikroba (antivirus, antibakteri, dan antijamur) sehingga dapat meningkatkan kekebalan tubuh [1]. Manfaat lain VCO dalam bidang kesehatan adalah untuk menurunkan kadar kolesterol. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh K.G. Nevin dan T. Rajamohan menunjukkan bahwa VCO dapat menurunkan kolesterol, fosfolipid, trigliserida, LDL kolesterol pada serum dan jaringan tikus. Di samping itu juga mampu menaikkan kadar HDL kolesterol. Hal ini tidak ditemukan pada perlakuan yang sama dengan menggunakan minyak kelapa sawit dan minyak kacang tanah. Aktivitas antihiperkolesterol ini diduga berhubungan dengan adanya kandungan senyawa fenolik yang tinggi dalam VCO [2].

Studi peranan senyawa fenolik dalam aktivitas antihiperkolesterol VCO dapat dilakukan secara *in vivo* dengan membandingkan profil lemak hewan coba yang diberi makanan tambahan VCO dengan kandungan senyawa fenolik tinggi dengan profil lemak hewan

coba yang diberi makanan tambahan VCO dengan kandungan senyawa fenolik rendah. Senyawa fenolik dalam buah kelapa terdapat terutama pada kulit ari yang membungkus buah kelapa. VCO yang dibuat dari kelapa dengan kulit ari diharapkan akan mempunyai kandungan senyawa fenolik yang lebih tinggi dibandingkan VCO yang dibuat dari kelapa tanpa kulit ari. Uji lain yang dilakukan adalah melihat profil lemak hewan coba setelah pemberian VCO dengan konsentrasi senyawa fenolik yang sangat rendah. Apabila ternyata aktivitas antihiperkolesterolnya tidak ada lagi membuktikan bahwa senyawa fenolik memainkan peranan penting. Metode kedua ini bisa dilakukan terhadap hewan coba yang sudah dalam kondisi hiperkolesterol agar pengamatan terhadap penurunan kolesterol lebih mudah diamati.

METODE PENELITIAN

Bahan

Sampel kelapa didapatkan dari daerah Bantul Yogyakarta. Tikus putih strain wistar didapatkan dari Unit Pengembangan Hewan Percobaan (UPHP LPPT-UGM), sedangkan reagen analisa serum menggunakan reagen Diasys kit.

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat refluks, hot plate, alat-alat

* Corresponding author. Tel/Fax : +62-274-545188
Email address : trijr_mipa@ugm.ac.id

gelas laboratorium (erlenmeyer, gelas beker, labu takar, corong pemisah, buret, corong, kuvet), neraca analitik, aquarium persegi, botol minum tikus, mikrohematokrit, tabung ependof, kapas, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), Microlab 300 (Merck), kromatografi gas (GC-Hewlett Packard 5890 Seri II), dan kromatografi gas-spektrometri massa (GC-MS Shimadzu QP5000).

Prosedur Kerja

Pembuatan minyak kelapa murni

Sampel VCO dibuat dari buah kelapa yang sudah tua dan segar. Pretama-tama 15 butir buah kelapa dibagi menjadi dua, separuh bagian dibersihkan kulit ari dan separuh bagian lainnya tetap ada lapisan kulit ari. Kemudian masing-masing parutan kelapa tersebut dibuat santan. Santan yang dihasilkan kemudian diolah menjadi VCO dengan proses pendiaman.

Penentuan kandungan asam lemak

Penentuan jenis dan komposisi relatif asam lemak dalam sampel VCO dilakukan dengan menggunakan alat kromatografi gas (GC) dan kromatografi gas spektrometri massa (GC-MS). Sebelum dianalisis, sampel VCO terlebih dahulu dibuat esternya dengan cara 100 μ L sampel ditambahkan 200 μ L BF₃-metanol dan kemudian direfluks pada suhu 60 °C selama 1 jam. Selanjutnya diekstrak menggunakan 500 μ L n-heksana. Hasil ekstrak diambil sebanyak 5 μ L diinjeksikan pada alat kromatografi gas Hewlett Packard 5890 Seri II dengan kolom CP-sil 5 CB, 50 m, menggunakan detektor FID (*Flame Ionization Detector*) dengan kondisi operasi gas pembawa He, temperatur injeksi 250 °C, temperatur kolom 260 °C, dan temperatur detektor 300 °C. Selanjutnya sampel juga dianalisis menggunakan kromatografi gas spektrometri massa Shimadzu QP5000 dengan kolom CP-sil 5 CB, 30 m, menggunakan detektor FID dengan kondisi operasi gas pembawa Helium (He), suhu injektor 280 °C, temperatur awal kolom 120 °C, dan temperatur detektor 300 °C.

Penentuan konsentrasi senyawa fenolik

Senyawa fenolik diekstrak dengan menggunakan metode Gutfinger [3-5]. Sebanyak 5 g sampel VCO ditimbang dan dilarutkan menggunakan 25 mL heksana selanjutnya diekstrak menggunakan 25 mL metanol 80 %. Hasil ekstrak diambil dan digunakan untuk analisis selanjutnya. Analisis konsentrasi senyawa fenolik dalam penelitian ini dilakukan menurut metode Folin Ciocalteu. Sebelum digunakan, reagen Folin Ciocalteu diencerkan dengan perbandingan 1:10. Diambil sebanyak 10 mL reagen Folin Ciocalteu dan dilarutkan menggunakan aquades dalam labu takar 100 mL. Disiapkan deret larutan standar asam galat dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, dan 250 ppm. Untuk analisisnya, setiap larutan standar, sampel, dan blanko diambil sebanyak 1 mL dan masing-masing dimasukkan

dalam labu takar 50 mL. Kemudian ditambahkan 2,5 mL reagen Folin Ciocalteu ditunggu 3-8 menit baru kemudian ditambahkan 2 mL Na₂CO₃ 20 %. Selanjutnya larutan ditambahkan aquadest hingga tanda batas 50 mL, larutan dikocok hingga tercampur rata. Larutan kemudian disimpan dalam tempat yang gelap selama \pm 2 jam. Setelah 2 jam, larutan diukur % transmitannya menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 740 nm.

Uji terhadap hewan percobaan

Hewan yang digunakan adalah tikus putih strain wistar dengan jenis kelamin jantan berusia 2 bulan dan berat badan 130-150 g. Dalam percobaan ini digunakan 10 ekor tikus putih yang dibagi menjadi 2 kelompok, masing-masing 5 ekor tikus, yaitu: Kelompok I diberikan makanan tambahan VCO yang tanpa kulit ari dan Kelompok II diberikan makanan tambahan VCO yang dengan kulit ari. Kondisi perlakuan sebagai berikut: pemberian pakan dilakukan pada waktu pagi dan sore sebanyak 100 g/harinya. Dosis minyak kelapa yang diberikan pada tikus adalah sebesar 0,04 mL/harinya untuk setiap ekor tikus. VCO diberikan dengan mencampurkannya dalam makanan. Untuk air minum diganti sehari sekali. Tikus dikondisikan seperti tersebut di atas selama 30 hari. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 31, dimana sebelumnya tikus dipuasakan selama 1 malam. Kemudian pada pagi harinya tikus mulai diambil darahnya melalui sinus orbitalis mata menggunakan mikrohematokrit. Untuk keperluan analisis profil lemak dalam liver dilakukan pembedahan untuk mengambil liver dilanjutkan ekstraksi lemak liver sesuai dengan prosedur yang dikembangkan Folch [6].

Untuk uji dengan tikus hiperkolesterol, delapan ekor tikus Wistar jantan berumur 2 bulan dengan berat badan 130-150 g ditentukan kadar kolesterol awal. Tikus kemudian dibuat hiperkolesterol dengan pemberian makanan tambahan kuning telur dan kolesterol murni selama satu minggu. Kadar kolesterol serum darah kemudian diukur. Apabila sudah didapatkan kondisi hiperkolesterol, tikus dibagi menjadi 2 kelompok. Kelompok I diberi makanan tambahan rendah senyawa fenolik dengan dosis sesuai pada uji dengan tikus normal. Kelompok II diperlakukan sebagai kontrol. Tikus dikondisikan seperti tersebut diatas selama 30 hari. Pengambilan darah dilakukan pada hari ke 31, dimana sebelumnya tikus dipuasakan selama 1 malam. Kemudian pada pagi harinya tikus mulai diambil darahnya melalui sinus orbitalis mata menggunakan mikrohematokrit.

Analisis serum darah hewan percobaan

Sebelum dianalisis, darah terlebih dahulu dibuat dalam bentuk serum dengan cara disentrifuge dengan kecepatan 12000 rpm selama 2 menit. Setelah darah disentrifuge, akan terbentuk serum pada lapisan atas

yang tampak bening. Selanjutnya cairan ini yang akan digunakan dalam analisis profil lemak yang meliputi: kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL. Analisis kolesterol total sebagai berikut: serum darah diambil sebanyak 5 μ L ditambahkan 500 μ L reagen untuk kolesterol (Diasys reagent) dan dikocok kemudian diinkubasi selama 20 menit. Sebagai blanko digunakan aquades. Selanjutnya diukur menggunakan alat microlab 300. Analisis trigliserida sebagai berikut: serum darah diambil sebanyak 5 μ L ditambahkan 500 μ L reagen untuk trigliserida (Diasys reagent) dan dikocok kemudian diinkubasi selama 30 menit. Sebagai blanko digunakan aquades dan selanjutnya dianalisa menggunakan alat microlab 300. Analisis HDL sebagai berikut: serum darah diambil sebanyak 5 μ L ditambahkan 500 μ L reagen untuk HDL (Diasys reagent) dan dikocok kemudian diinkubasi selama 20 menit. Sebagai blanko digunakan aquades. Selanjutnya diukur menggunakan alat microlab 300. Analisis LDL: untuk analisa LDL, karena dari parameter kolesterol total, trigliserida, dan HDL sudah diketahui maka penentuan konsentrasi LDL melalui perhitungan sebagai berikut :

$$\text{LDL} = [\text{kolesterol total}] - [\text{HDL}] - \frac{[\text{trigliserida}]}{5}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan asam lemak pada minyak kelapa murni

Penentuan kandungan asam lemak dalam VCO dilakukan untuk mengetahui kualitas dari VCO tersebut. Untuk membuktikan dugaan bahwa keberadaan kulit ari dari bahan baku kelapa tidak berpengaruh terhadap komposisi dan kandungan minyak kelapa murni, dilakukan pembuatan VCO dari kelapa dengan kulit ari dan tanpa kulit ari dari sampel kelapa yang sama. Penggunaan bahan kelapa yang sama ini untuk menjamin bahwa hanya faktor kulit ari yang membedakan minyak hasil. Jika komposisi asam lemak dari minyak yang dihasilkan berbeda maka hanya dikarenakan faktor kulit ari. Hal ini mengingat komposisi lemak dalam minyak juga sangat ditentukan oleh asal buah kelapa [7].

Berdasarkan hasil analisis kandungan asam lemak dalam VCO dengan kulit ari maupun minyak kelapa tanpa kulit ari diperoleh bahwa kandungan asam lemak VCO dari kedua jenis minyak tersebut tidak berbeda secara signifikan.

Konsentrasi senyawa fenolik

Pada penentuan senyawa fenolik dalam VCO diperoleh hasil bahwa kandungan senyawa fenolik pada VCO dari kelapa dengan kulit ari jauh lebih besar (lebih dari 3 kali lipat) apabila dibandingkan VCO dari kelapa tanpa kulit ari. VCO dari kelapa dengan kulit ari

Tabel 1. Hasil analisis asam lemak minyak kelapa murni

Asam lemak dalam bentuk ester	% relatif	
	VCO dari kelapa dengan kulit ari	VCO dari kelapa tanpa kulit ari
Asam kaproat	0,75	0,80
Asam kaprilat	9,98	10,08
Asam kaprat	8,00	7,96
Asam laurat	50,66	50,33
Asam miristat	16,38	16,12
Asam palmitat	6,84	6,84
Asam linoleat	0,65	0,76
Asam oleat	4,62	4,86
Asam stearat	2,06	2,19

mengandung senyawa fenolik 75,92 mg/kg minyak (VCO fenolik tinggi) sedangkan VCO dari kelapa tanpa kulit ari mengandung senyawa fenolik 23,87 mg/kg minyak (VCO fenolik rendah). Hal ini dimungkinkan karena senyawa fenolik dalam kelapa lebih banyak berada kulit ari kelapa.

Keberadaan senyawa fenolik dalam VCO juga dapat dipengaruhi oleh proses pembuatan VCO itu sendiri. Adanya pemanasan dalam pembuatan VCO ataupun adanya penambahan kimia dan cara fermentasi juga akan mempengaruhi kandungan senyawa fenolik dari minyak yang dihasilkan. Pada minyak kelapa hasil pengolahan kopra hampir semua senyawa fenolik telah rusak selama proses sehingga perlu ditambahkan antioksidan. Keberadaan senyawa fenolik dalam VCO juga dapat membuat VCO menjadi lebih tahan lama. Karena senyawa fenolik dalam minyak kelapa dapat berperan sebagai antioksidan dimana antioksidan ini yang akan membuat VCO bertahan lebih lama. Senyawa fenolik dalam minyak kelapa merupakan salah satu komponen yang dapat memberikan manfaat dalam menurunkan kadar kolesterol dalam darah selain kandungan komponen lainnya dalam minyak kelapa murni. Hal ini sama seperti pada penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Colquhoun [8] dimana menyatakan bahwa bukan hanya karena adanya asam lemak dalam minyak zaitun yang dapat mempengaruhi efek dari antioksidan. Selain itu dalam penelitiannya, senyawa fenolik mungkin juga dapat menghalangi metabolisme eicosanoid, berperan sebagai antiplatelet, dan juga menaikkan HDL [9].

Hasil uji terhadap tikus wistar

Dari hasil penelitian penggunaan VCO yang sudah divariasasi menjadi VCO dengan kulit ari dan VCO tanpa kulit ari terhadap tikus strain wistar diperoleh data sebagai berikut pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil analisis profil lemak pada serum darah tikus

Jenis	Kelompok I (Diperlakukan VCO fenolik tinggi)	Kelompok II (Diperlakukan VCO fenolik rendah)
Berat badan (g)	183 ± 17	180 ± 11
Kolesterol total (mg/dL)	70 ± 12	82 ± 12
Trigliserida (mg/dL)	76 ± 23	100 ± 25
HDL (mg/dL)	20 ± 4	21 ± 3
LDL (mg/dL)	25 ± 10	41 ± 14

Tikus wistar yang diberi VCO dengan senyawa fenolik tinggi mempunyai profil lemak serum darah yang lebih baik dibandingkan dengan tikus wistar yang diberi VCO dengan senyawa fenolik rendah. Hal ini ditunjukkan dengan hasil kolesterol total rata-rata, trigliserida rata-rata, dan LDL rata-rata yang berbeda secara signifikan, sedangkan harga HDL rata-rata tidak terlalu berbeda untuk kedua perlakuan. Hasil ini sedikit berbeda dengan perlakuan yang sama tetapi menggunakan virgin olive oil dimana senyawa fenolik dapat meningkatkan nilai HDL [9]. Untuk serum liver diperoleh data kolesterol total: 7 mg/dL, trigliserida: 19 mg/dL untuk tikus kelompok I dan kolesterol total: 9 mg/dL, trigliserida: 34 mg/dL untuk tikus kelompok II. Hasil ini juga menunjukkan adanya profil lemak yang lebih baik pada tikus yang diperlakukan dengan VCO fenolik tinggi. Perbaikan profil lemak oleh senyawa fenolik ini sesuai dengan hipotesis yang disampaikan oleh Nevin dan Rajamohan [2].

Selain uji di atas dilakukan juga uji dengan tikus wistar hiperkolesterol. Dengan perlakuan menggunakan kuning telur dan kolesterol murni selama satu minggu kadar kolesterol rata-rata serum mengalami kenaikan dari 64 ± 7 mg/dL menjadi 144 ± 2 mg/dL yang berarti sudah mengalami hiperkolesterol (berdasarkan pengalaman empiris kadar normal kolesterol total dalam serum tikus selalu dibawah 80 mg/dL). Perlakuan selanjutnya dengan menggunakan VCO fenolik rendah selama 30 hari mengakibatkan penurunan kadar kolesterol total serum tikus hiperkolesterol sebanyak 52,25 % menjadi 63 ± 11 mg/dL. Sementara kelompok tikus yang tidak diperlakukan dengan VCO mengalami penurunan kadar kolesterol total serum sebanyak 48,61% menjadi 74 ± 8 mg/dL. Mengingat lamanya waktu perlakuan dan deviasi hasil maka penurunan kadar kolesterol yang dialami dua kelompok tidaklah berbeda signifikan. Hal ini berarti perlakuan VCO fenolik rendah tidak efektif dalam menurunkan kadar kolesterol total serum darah tikus. Hal ini sesuai dengan hasil uji sebelumnya yang menyimpulkan dugaan peranan senyawa fenolik dalam aktivitas antihiperkolesterol VCO.

Mekanisme penurunan kolesterol oleh senyawa fenolik sendiri masih perlu dikaji lebih lanjut. Obat-obat antihiperkolesterol yang sekarang digunakan adalah

merupakan golongan statin seperti simvastatin dan lavostatin yang merupakan golongan senyawa poliketida [10]. Mekanisme obat-obatan golongan ini adalah dengan menghambat biosintesis kolesterol pada tahap reduksi HMG-KoA dalam sel liver sehingga meningkatkan pengambilan kolesterol dari darah oleh liver [11-12]. Mengingat poliketida dan asam lemak, komponen utama VCO, disintesis oleh enzim yang sangat mirip (polyketida syntase, PKS dan fatty acid sintase, FAS) sangat dimungkinkan adanya senyawa golongan poliketida dalam senyawa-senyawa minor VCO.

Hipotesis lain tentang mekanisme antihiperkolesterol senyawa fenolik adalah senyawa fenolik meningkatkan metabolisme kolesterol. Beberapa senyawa fenolik seperti b-sitosterol telah terbukti meningkatkan metabolisme kolesterol [13].

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan bahwa konsentrasi asam lemak dalam sampel VCO yang dengan kulit ari dan konsentrasi asam lemak dalam sampel VCO yang tanpa kulit ari tidak berbeda secara signifikan. Senyawa fenolik dalam VCO yang dengan kulit ari lebih besar konsentrasinya daripada senyawa fenolik dalam VCO yang tanpa kulit ari dengan konsentrasinya sebesar 9,16 % pada VCO dengan kulit ari dan 2,88 % pada VCO tanpa kulit ari dan kandungan senyawa fenolik dalam VCO dapat berperan dalam menurunkan profil lemak dalam darah yaitu: kadar kolesterol, trigliserida, HDL, dan LDL.

DAFTAR PUSTAKA

- Kabara, J. J., 1996, *Health Oils from Tree of Life (Nutritional and Health Aspects of Coconut Oil)*, Universities and Government Agencies, Galena, Illionis.
- Nevin, K. G., and T. Rajamohan., 2004, *Canadian Soc. Clinical Chem.*, 37, 830-835.
- Gutfinger., 1981, *J. Am. Oil. Chem.*, 58, 966-968.
- Asami, D.K., Hong, Y-J., Barret, and Mitchell D.M., 2003, *J. Agric. Food. Chem.*, 51, 1237-1241
- Desai, I.D., Bhagavan, H., Slaked, R., de Olievera, J.E.D., 1988, *J. Food Comp. Anal.*, 1, 231-238
- Folch, J., Lees, M. and Stanley, G.H., 1956, *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Ketaren, S., 1986, *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*, UI Press, Jakarta.
- Coulquhoun, D. M., Hicks B. J., and Reed A. W., 1996, *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 5, 105-107.
- Mangas-Cruz, M.A., Fernandez-Moyano, A., Albi, T., Guinda, A., Relimpio, F., Lanzon, A., Pereira, J.L., Serrera, J.L., Montila, C., Astorga, R., and

- Garcia-Luna, P.P, 2001, *Clinical Nutrition*, 20 (3) 211-215
10. Samuelsson, G., 1999, *Drugs of Natural Origin*, a Textbook of Pharmacognosy, Edisi Keempat, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm
 11. Matthew & van Holde, 2000, *Biochemistry*, Benjamin Cumming, San Fransisco
 12. Murray, R. K., Daryl, K. G., Peter, A. M., and Victor, W. R., 1996, *Biokimia Harper*, Edisi 24, (translation by : Andry Hartono), Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
 13. Foye, W.O, 1981, Prinsip-prinsip Kimia Medisinal (translation by Rasyid dkk), edisi 2, jilid 1, UGM Press, Yogyakarta