



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PRODUKSI LOVASTATIN KAPANG *Aspergillus* spp. DAN  
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR KOLESTEROL DALAM DARAH  
TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley**

**TESIS**

**YANTI RAFLIYANTI  
0806420436**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
PROGRAM PASCASARJANA  
DEPOK  
JULI 2010**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**PRODUKSI LOVASTATIN KAPANG *Aspergillus* spp. DAN  
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR KOLESTEROL DALAM DARAH  
TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley**

**TESIS**

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains

**YANTI RAFLIYANTI  
0806420436**


**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
PROGRAM PASCASARJANA  
DEPOK  
JULI 2010**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

**Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.**

Nama : Yanti Rafliyanti

NPM : 0806420436

Tanda Tangan : 

Tanggal : 15 Juli 2010

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh

Nama : Yanti Rafliyanti  
NPM : 0806420436  
Program Studi : Biologi  
Judul Tesis : PRODUKSI LOVASTATIN KAPANG  
*Aspergillus* spp. DAN  
PENGARUHNYA TERHADAP  
KADAR KOLESTEROL DALAM  
DARAH TIKUS (*Rattus norvegicus* L.)  
GALUR Sprague Dawley

**Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.**

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc (.....)

Pembimbing : Dr. Dadang Kusmana M.Si (.....)

Penguji : Drs. Iman Santoso M.Phil (.....)

Penguji : Dra. Setiorini M.Kes (.....)

Ditetapkan di: Depok  
Tanggal : 15 Juli 2010



## KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur bagi Allah yang selalu melimpahkan kebahagiaan, rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan tesis yang berjudul “Produksi lovastatin kapang *Aspergillus* spp. dan pengaruhnya terhadap kadar kolesterol dalam darah tikus (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague Dawley. Saya menyadari bahwa, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sangatlah sulit bagi saya untuk menyelesaikan skripsi ini. Oleh karena itu, saya mengucapkan terima kasih kepada:

- (1) Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc. dan Dr. Dadang Kusmana M.Si. selaku pembimbing tesis, yang dengan penuh kesabaran dan ketekunan memberikan bekal ilmu, arahan, dan dukungan hingga selesainya penelitian dan penyusunan tesis ini.
- (2) Drs. Iman Santoso M.Phil. dan Dra. Setiorini M.Kes. selaku dosen penguji.
- (3) Dr. Luthfiralda Sjafirdi M.Biomed. dan Dr. Nisyawati selaku Ketua dan Sekretaris Program Studi Pascasarjana, Departemen Biologi, FMIPA-UI, yang banyak membantu banyak dalam memberikan semangat, pengarahan, dan pengurusan administrasi.
- (4) Direktur Perguruan Islam Al-Izhar Pondok Labu Drs. H. Yuliantoronto dan Kepala Sekolah SMA Islam Al-Izhar Pondok Labu Ir. H. Tato Hendarto M.Psi, yang telah memberikan kesempatan seluas-luasnya kepada penulis untuk menempuh dan menyelesaikan jenjang pendidikan S-2 di Universitas Indonesia.
- (5) Cisca Lasmaria S.P. teman seperjuangan yang selalu menemani dalam suka dan duka. Pak Ahmad Supriyadi S.I.P. yang banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian, serta seluruh rekan kerja di SMA Islam Al-Izhar Pondok Labu khususnya Maruto Santoso S.Si. dan Hari Prasetyo S.P. yang banyak membantu penulis dalam pelaksanaan tugas di sekolah.
- (6) Suami tercinta Rachmat Widodo Adi Ph.D. (Almarhum).

- (7) Kebanggaanku Athena Syarifa dan Abdurrahman Saleh yang telah memberikan cinta, semangat dan pengorbanan luar biasa sehingga penulis mendapatkan energi untuk terus menulis dan menyelesaikan tesis ini.
- (8) Ayahanda H. Ramli Ghazali dan Ibunda Hj. Ratnasih (almarhum), Bapak dan Ibu mertua terkasih H. Harry Mulyono Kasran dan Hj. Sukati M. Kasran serta adik2 yang selalu mendorong untuk lebih maju.

Penelitian dan penulisan tesis ini masih jauh dari yang diharapkan karena keterbatasan ilmu yang penulis miliki, sehingga saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata, saya berharap Allah SWT berkenan membalas segala kebaikan semua pihak yang telah membantu. Semoga skripsi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu.

Depok, 15 Juli 2010

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI  
TUGAS AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

---

Sebagai Civitas Akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yanti Rafliyanti  
NPM : 0806420436  
Program Studi : Pasca Sarjana  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis karya : Tesis

demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul :

**PRODUKSI LOVASTATIN KAPANG *Aspergillus* spp. DAN  
PENGARUHNYA TERHADAP KADAR KOLESTEROL DALAM DARAH  
TIKUS (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley**

beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok

Pada tanggal : 15 Juli 2010

Yang menyatakan

  
(Yanti Rafliyanti)

Title : Lovastatin Production of *Aspergillus* spp. and their effect on blood cholesterol levels in rats (*Rattus norvegicus* L.) strain Sprague Dawley.

Thesis Supervisors: Dr. Wibowo Mangunwardoyo M.Sc.  
Dr. Dadang Kusmana M.Si.

---

## SUMMARY

Lovastatin is an inhibitor of synthesis cholesterol in the liver. The mechanism of inhibitor is a competitive inhibitor of the HMG-CoA with the enzyme *HMG CoA reductase* (Manzoni *et al.* 2002). The first research done by Endo *et al.* (1976) is producing lovastatin naturally from the mold of *Monascus ruber*. Screening has been done on the lovastatin production from class of Basidiomycetes and Deuteromycetes such as from the genus *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pleurotus* and *Trichoderma* (Saimee 2003). Extraction of the lovastatin was carried out from the culture of *Aspergillus terreus* (Albert *et al.* 1980).

University of Indonesia Culture Collection (UICC) has collected indigenous bacteria, yeast and molds. Research on the bioprospecting of the microorganism has not yet carried out that much as for that the research is. Lovastatin is one of the secondary metabolism of molds which produced by polyketide metabolism. Lovastatin is important for inhibited the *HMG CoA reductase* during biosynthesis of cholesterol. The high cholesterol in the blood vessel is a trigger of the coronary vascular diseases (CVDs).

This study consists of two parts. Parts I entitled: Analysis of lovastatin from molds *Aspergillus* spp. University of Culture Collection (UICC) collection. Part II entitled: Potency of lovastatin extract from *Aspergillus* spp. molds on decreasing cholesterol level in the rat blood (*Rattus norvegicus* L.) strain *Sprague Dawley*. The research was carried out at the Microbiology Laboratory, The Reproduction and Development Laboratory, The Biology Department, The Analytical Chemistry Laboratory, The Department of Pharmacy, The Faculty of Mathematic and Natural Sciences, University of Indonesia, Balitro, Bogor. The whole research was during August 2009 – April 2010.

The results revealed that out of 40 isolates, 18 (45%) isolates of *Aspergillus* spp. showed the clear zone around the paper disc with the zone of 1.23 – 5.2 mm such as: *Asp. terreus*, *Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. fumigatus* UICC 358, *Asp. flavus* UICC 359 and *Asp. flavus* UICC 360. For the amount of 22 (55%) other isolate did not show the clear zone such as *Asp. ochraceus*, *Asp. niger* (371), *Asp. niger* (77), *Asp. tubingensis* etc.

The production of lovastatin on ten selected molds on the Czapek Dox Broth (CDB) medium grown in the shaker at 100 rpm, at room temperature (26 – 29°C), for 48 hours incubations, and the results of fermentation extracted using ethyl-acetate (1 : 1), produced the average of lovastatin extract 9.9 – 85.8 mg/L, the highest was *Asp. flavus* UICC 360 and the lowest was *Asp. awamori* UICC 31.

During fermentation the pH changed. At the beginning the initial pH was at 6.5, at the end of fermentation the pH turned to acidic 3 – 6 (*Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. terreus*, *Asp. flavus* UICC 360, *Asp. awamori* UICC 31, *Asp. flavus* UICC 359, *Aspergillus* sp. Shi 18.1 and *Aspergillus* sp. Shi 3.2). However *Asp. terreus* UICC 370, *Aspergillus* sp. AwyV.1 dan *Aspergillus* sp. Shi 2.2 increased up to neutral pH.

Thin Layer Chromatography (TLC) Analysis method by using silica gel plate F<sub>254</sub>, observed at  $\lambda$  282 nm, with eluent dichlorometan : ethyl-acetate (7 : 3) (v/v). The R<sub>f</sub> value was observed at 0.23 – 0.27 and the R<sub>f</sub> lovastatin as the R<sub>f</sub> standard 0.24. The sample with the highest R<sub>f</sub> (0.27) was *Asp. terreus* UICC 370 and the lowest R<sub>f</sub> (0.23) were *Asp. awamori* UICC 31, *Aspergillus* sp. Shi 18.1 and *Aspergillus* sp. Shi 3.2. The samples with the same R<sub>f</sub> as the R<sub>f</sub> standard (0.24) were *Aspergillus* sp. Shi 2.2, *Asp. flavus* UICC 360 and *Asp. flavus* UICC 359. This confirmed that those samples quantitatively consisted of lovastatin by using TLC method.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of *Asp. flavus* UICC 360 using column C-18 (250 x 46 cm), eluent acetonitril and phosphate acid (60:40) (v/v), with the rate 1.5 ml/minute, detection at  $\lambda$ 235 nm, temperature column at 30°C. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis indicated only one peak at standard lovastatin with retention time at 13.2 minute,

meanwhile chromatogram of extract lovastatin isolate of *Asp. flavus* UICC 360 showed the similar one peak and the retention time at 13.2 minutes.

The research of lovastatin extracts potential as the result of fermentation of *Asp. flavus* UICC 360 was given to 25 rats. The rats for the research were using *Rattus norvegicus* L. strain Sprague Dawley, and selected by sex (male). Range of their weight was 200–250 g, and their age about two months. The rats were acclimatization for 14 days fed ad libitum. The initial measurement of the total cholesterol, tryglyceride, HDL cholesterol and LDL cholesterol were measured before treatment. The cholesterol of rats were increased with addition of 2.5 ml/day coconut oil . The results showed the feeding with 2.5 ml of coconut oil for 14 days was increased total cholesterol 24.8% up to 77.44 mg/dL from the initial 62.04 mg/dL, tryglyceride enhanced from 48.0 mg/dL to 79.36 mg/dL (65.3%), HDL cholesterol decreased from 33.8 mg/dL to 32.8 mg/dL (2.95%). LDL cholesterol increased from 19.64 mg/dL to 28.36 md/dL (43.38%%). The analitical statistics indicated the significant difference for all of measurement studied.

The result from the analysis of total cholesterol, tryglyceride, HDL cholesterol and LDL cholesterol after treatment with extract lovastatin *Asp. flavus* UICC 360 with treatment A (dose 0.1 mg/day), treatment B (dose 0.2 mg/day), treatment C (dose 0.4 mg/day), treatment E (positive controle) and negative controle treatment D indicated the increasing total cholesterol in the blood of rat but no significant difference in treatments. Tryglyceride analysis was decreased after lovastatin treatment of all doses appllied, and there was a significant difference, the optimum decrease would be at 61.7% in treatment A (dose 0.1 mg/day). HDL cholesterol analysis indicated increasing at 9.2% in treatment C (dose 0.4 mg/day), and LDL analysis was decreased up to 90% after treatment with dose 0.4 mg/day lovastatin extract.

xix + 96p; 13 appnd; 24 plates; 4 tables

Bibl.; 68 (1965 – 2009)

## ABSTRAK

Nama : **YANTI RAFLIYANTI**  
Program Studi : **BIOLOGI**  
Judul : **PRODUKSI LOVASTATIN PADA KAPANG *Aspergillus* spp. KOLEKSI UNIVERSITY OF INDONESIA CULTURE COLLECTION (UICC)**

Lovastatin dapat berfungsi menghambat proses pembentukan kolesterol dalam hati, dengan cara penghambatan secara kompetitif terhadap sintesis enzim 3 hydroxy -3-methylglutaryl-koenzim A reduktase (HMG-KoA reduktase). Penelitian bertujuan untuk melakukan skrining kapang *Aspergillus*. spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC), fermentasi, dan analisis produksi lovastatin. Hasil skrining lovastatin dari sebanyak 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC 18 biakan (45%) positif menghasilkan lovastatin dan 22 biakan (55%) negatif. *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin tertinggi dibandingkan sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih. Analisis *Thin Layer Chromatography* (TLC) menunjukkan nilai Rf sepuluh *Aspergillus* spp. hampir sama dengan standart. Analisis *High Performance Chromatography* (HPLC) mengkonfirmasi lovastatin *Asp. flavus* UICC 360 mempunyai waktu retensi sama dengan standart (13,2 menit).

### **Kata kunci:**

Biosintesis, *Candida albicans* Y-29, fermentasi, skrining, *Thin Layer Chromatography* (TLC).

## ABSTRACT

Lovastatin is an acting inhibitor of enzyme 3 hydroxy -3-methylglutaryl-coenzyme A reduktase (HMG-CoA reductase) as competitive inhibitor on biosynthesis of cholesterol. The aims of the research is for the selection, fermentation, and analysis of lovastatin from isolates mold *Aspergillus* spp. at the University of Indonesia Culture Collection (UICC). The results revealed that out of 40 cultures, 18 cultures (45%) produced lovastatin and 22 cultures (55%) were negative. *Aspergillus flavus* UICC 360 showed the highest lovastatin production compared of 10 selected cultures. *Thin Layer Chromatography* (TLC) analysis amount of 10 *Aspergillus* spp. have similarity of Rf value compared to the standard. *High Performance Chromatography* (HPLC) analysis confirmed that lovastatin *Aspergillus flavus* UICC 360 has the same retention time with the standard (13.2 minutes).

### **Key words:**

Biosynthesis, *Candida albicans* Y-29, fermentation, screening, *Thin Layer Chromatography* (TLC).

## ABSTRAK

Nama : **YANTI RAFLIYANTI**  
Program Studi : **BIOLOGI**  
Judul : **PENGARUH EKSTRAK LOVASTATIN KAPANG *Aspergillus* spp. TERHADAP KADAR KOLESTEROL DALAM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.) GALUR Sprague Dawley.**

Lovastatin adalah inhibitor kompetitif yang potensial dalam aktivitas 3-*hidroksi-3-metilglutaril-CoA* (HMG-CoA) reduktase yang berperan dalam biosintesis kolesterol. Penelitian dilakukan dengan pemberian ekstrak lovastatin yang dihasilkan dari fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 dengan tiga macam dosis yang berbeda (0,1, 0,2 dan 0,4 mg/hari) pada tikus putih dan menganalisis pengaruhnya terhadap kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus, percobaan dilakukan selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan lovastatin pada dosis 0,1 % mg/hari menurunkan kadar total kolesterol, trigliserida dan kolesterol LDL serta meningkatkan kolesterol HDL secara statistik tidak nyata, pada dosis 0,2 mg/hari menurunkan trigliserida sampai (61,76%) dengan beda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan kontrol negatif (21,28%), lovastatin pada dosis 0,4 mg/hari dapat menurunkan kadar kolesterol LDL (90%) dengan beda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan kontrol negatif (59,74%).

**Kata Kunci:** kolesterol HDL, kolesterol LDL, analisis, biosintesis, kolesterol total, trigliserida.

## ABSTRACT

Lovastatin is a competitive potential inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase activity, which plays a role in cholesterol biosynthesis. In this study, rats were given extract lovastatin produced from the fermentation of *Asp. flavus* UICC 360 with various of doses (0.1, 0.2 and 0.4 mg/day) on the rats and examined the effect on serum total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and LDL cholesterol in the blood of rats for 14 days treatment. The lovastatin dose was given at 0,1 mg/day not only decreased the total cholesterol, triglyceride and LDL cholesterol, but also increased HDL cholesterol eventhough was not significant, and the dose lovastatin given at 0.2 mg/day caused lowering the triglyceride (61.76%) at level ( $p < 0.01$ ) compared with negative control (21.28%), also the dose lovastatin given of 0.4 mg/day was able to decrease LDL cholesterol levels (90%) at level ( $p < 0,01$ ) compared to the negative control (59.74%).

**Keywords:** HDL cholesterol, LDL cholesterol, analysis, biosynthesis, cholesterol total, trygliceride.



## DAFTAR ISI

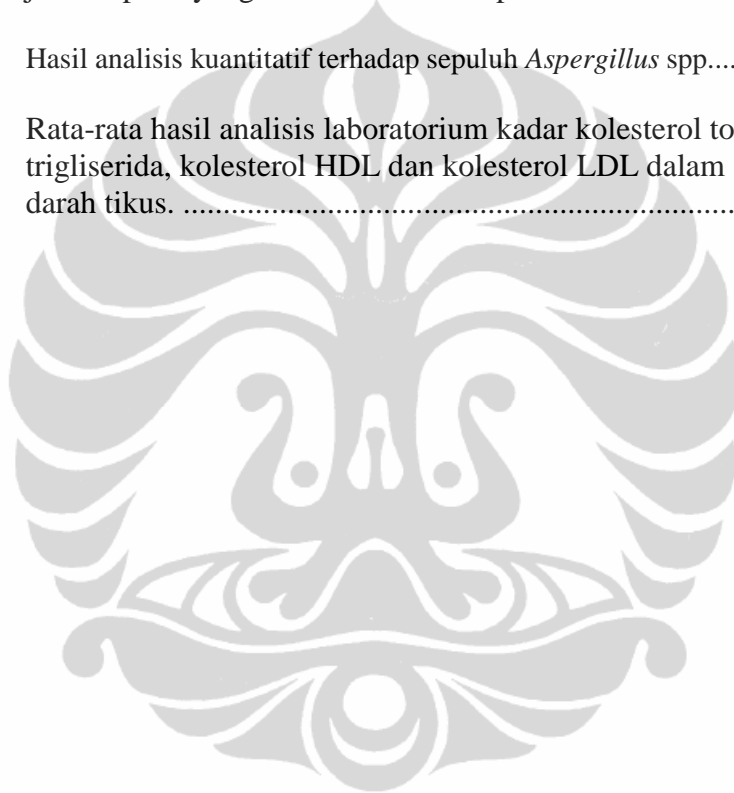
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
LEMBAR PERSETUJUAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH.....	vii
SUMMARY.....	viii
ABSTRAK .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvii
DAFTAR TABEL.....	xix
PENGANTAR PARIPURNA.....	1
MAKALAH 1: PRODUKSI LOVASTATIN PADA KAPANG <i>Aspergillus</i> spp. KOLEKSI UNIVERSITY OF INDONESIA CULTURE COLLECTION (UICC)	
1. PENDAHULUAN.....	4
1.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	8
1.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja.....	8
2. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	14
2.1 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis <i>Aspergillus</i> spp.....	14
2.2 Skrining Lovastatin dari <i>Aspergillus</i> spp. dengan metode paper disk (Ferron <i>et al.</i> 2005).....	15
2.3 Fermentasi lovastatin terhadap sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. terpilih koleksi UICC dalam medium cair <i>Czapek Dox</i> <i>Broth</i> (CDB).....	19
2.4 Analisis kualitatif senyawa lovastatin pada sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).....	28
2.5 Analisis kuantitatif senyawa lovastatin terhadap sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).....	32
2.6 Analisis HPLC Lovastatin dari <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	33
3. KESIMPULAN DAN SARAN.....	35
3.1 Kesimpulan.....	35
3.2 Saran.....	35
DAFTAR ACUAN.....	36
LAMPIRAN.....	41

MAKALAH II: PENGARUH EKSTRAK LOVASTATIN KAPANG  
*Aspergillus* spp. TERHADAP KADAR KOLESTEROL  
DALAM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.)  
GALUR Sprague Dawley

1. PENDAHULUAN.....	57
1.1 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	60
1.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja.....	60
2. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	65
2.1 Analisis data kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa.....	65
2.2 Analisis kadar kolesterol total dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> UICC 360.....	67
2.3 Analisis kadar trigliserida dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi <i>Aspergillus</i> <i>flavus</i> UICC 360.....	68
2.4 Analisis kadar <i>high density lipoprotein</i> (HDL) dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	70
2.5 Analisis kadar kolesterol <i>low density lipoprotein</i> (LDL) dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	72
3. KESIMPULAN DAN SARAN.....	74
3.1 Kesimpulan.....	74
3.2 Saran.....	74
DAFTAR ACUAN.....	76
LAMPIRAN.....	79
DISKUSI PARIPURNA.....	90
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN.....	94
DAFTAR ACUAN.....	95

## DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Hasil skrining dan ekstraksi sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC) pada medium Czapek Dox Broth (CDB) selama 48 jam.....	22
Tabel 1.2	Hasil pengamatan terhadap warna medium, warna dan jumlah pelet yang terbentuk selama proses fermentasi.....	23
Tabel 1.3	Hasil analisis kuantitatif terhadap sepuluh <i>Aspergillus</i> spp.....	32
Tabel 2.1	Rata-rata hasil analisis laboratorium kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus. ....	75



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Struktur kimia lovastatin dalam bentuk asam- $\beta$ - hidroksi dan lakton.....	4
Gambar 1.2	Gambar zona bening, kontrol positif dan negatif bioassay <i>Aspergillus</i> spp. terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29.....	15
Gambar 1.3	Diagram hasil skrining aktivitas lovastatin 40 <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29.....	16
Gambar 1.4	Hasil skrining aktivitas lovastatin sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection terhadap <i>Candida albicans</i> UICC Y-29.....	18
Gambar 1.5	Nilai Rf, tinggi dan luas area standart dan sepuluh sampel lovastatin <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection .....	30
Gambar 1.6	Diagram 3-D dari kurva densitas bercak-bercak lovastatin sepuluh <i>Aspergillus</i> spp. Koleksi University of Indonesia Culture Collection .....	31
Gambar 1.7	Kromatogram <i>High Performance Liquid Chromatography</i> (HPLC) lovastatin pada <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	34
Gambar 2.1	Biosintesis kolesterol.....	58
Gambar 2.2.	Perbandingan persentase rata-rata kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus sesudah pemberian minyak kelapa.....	66
Gambar 2.3	Perbandingan persentase rata-rata penurunan kolesterol total sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif).....	68
Gambar 2.4.	Perbandingan persentase rata-rata penurunan trigliserida sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif).....	70

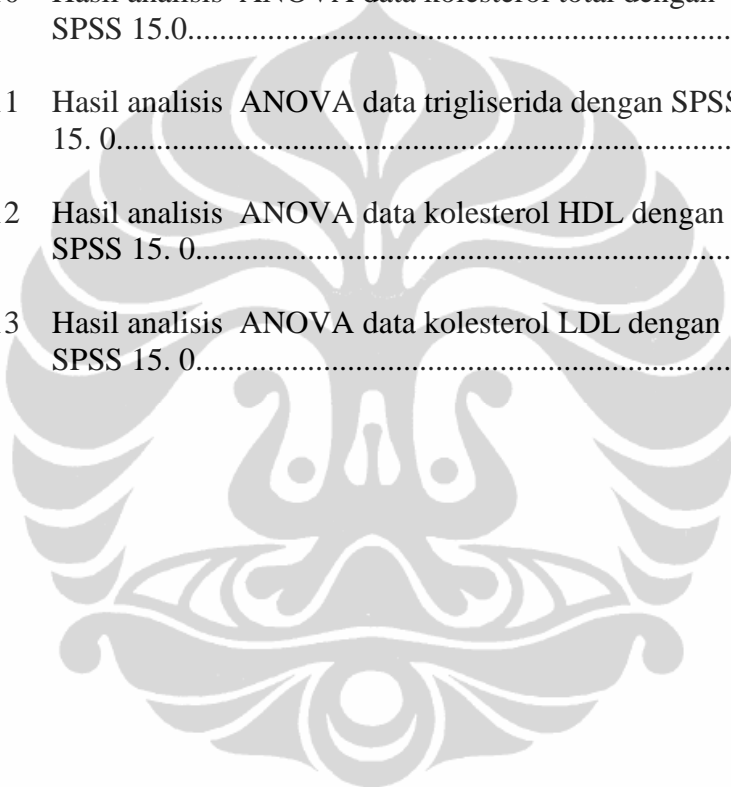
Gambar 2.5. Perbandingan persentase rata-rata peningkatan kolesterol HDL sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif).....	72
Gambar 2.6 Perbandingan persentase rata-rata penurunan kolesterol LDL sesudah pemberian perlakuan perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif).....	73



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.1	Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).....	41
Lampiran 1.2	Alur kerja persiapan kapang <i>Aspergillus</i> spp.....	48
Lampiran 1.3	Alur kerja persiapan bioassay <i>Candida albicans</i> UICC Y-29.....	49
Lampiran 1.4	Alur kerja persiapan skrining assay lovastatin.....	50
Lampiran 1.5	Alur kerja persiapan inokulum <i>Aspergillus</i> spp. terpilih.....	51
Lampiran 1.6	Alur kerja persiapan fermentasi produksi Lovastatin....	52
Lampiran 1.7	Alur kerja persiapan analisis Kadar Lovastatin dengan TLC.....	53
Lampiran 1.8	Alur kerja persiapan produksi Lovastatin untuk uji kolesterol.....	54
Lampiran 1.9	Kurva kalibrasi standart lovastatin berdasarkan tinggi puncak.....	55
Lampiran 1.10	Kurva kalibrasi standart lovastatin berdasarkan luas area puncak.....	55
Lampiran 1.11	Rumus perhitungan kadar lovastatin pada sampel.....	55
Lampiran 2.1	Komposisi nutrien dalam pakan hewan uji.....	79
Lampiran 2.2	Kelompok perlakuan berdasarkan perbedaan dosis lovastatin.....	80
Lampiran 2.3	Gambar pemberian ekstrak lovastatin secara oral menggunakan alat cekok gavage (sonde lambung).....	80
Lampiran 2.4	Hasil Pengamatan makroskopis dan mikroskopis <i>Aspergillus</i> spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).....	81
Lampiran 2.5	Ekstrak lovastatin hasil fermentasi <i>Aspergillus flavus</i> UICC 360.....	82
Lampiran 2.6	Pengambilan darah pada tikus melalui sinus orbitalis...	82

Lampiran 2.7	Prinsip reaksi analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL, kolesterol LDL.....	83
Lampiran 2.8	Rumus perhitungan kadar kolesterol total dan trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL.....	84
Lampiran 2.9	Hasil uji t (Paired sample test) Kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL, kolesterol LDL sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa dengan SPSS 15.0.....	85
Lampiran 2.10	Hasil analisis ANOVA data kolesterol total dengan SPSS 15.0.....	
Lampiran 2.11	Hasil analisis ANOVA data trigliserida dengan SPSS 15. 0.....	87
Lampiran 2.12	Hasil analisis ANOVA data kolesterol HDL dengan SPSS 15. 0.....	88
Lampiran 2.13	Hasil analisis ANOVA data kolesterol LDL dengan SPSS 15. 0.....	89



## PENGANTAR PARIPURNA

September 2009 World Health Organization (WHO) melaporkan bahwa dibandingkan dengan penyakit infeksi, kanker, dan diabetes penyakit *Cardio Vascular Diseases* (CVDs) merupakan penyebab kematian nomor satu di dunia. Pada tahun 2005 sekitar 17,5 juta orang meninggal akibat CVDs, 7,6 juta diantaranya karena penyakit jantung koroner dan 5,7 juta karena stroke. Pada tahun 2030 diperkirakan, sebanyak 23,6 juta orang akan meninggal akibat CVDs, peningkatan jumlah terbesar kematian akan terjadi di Asia Tenggara.

Salah satu penyebab penyakit CVDs adalah *hiperkolesterolemia* yaitu tingginya kadar kolesterol total dalam darah atau melebihi 239 mg/dL (Cuchel *et al.* 1997). *Hiperkolesterolemia* dapat menyebabkan penumpukan lemak pada dinding pembuluh darah (*atherosclerosis*) yang menyuplai darah ke jantung (Cheung *et al.* 1993). Penumpukan lemak tersebut membuat pembuluh darah semakin mengeras dan tidak lentur, sehingga mempersempit pembuluh darah dan menghambat jumlah darah yang dapat melewatinya. Keadaan tersebut dapat menyebabkan gangguan kardiovaskular seperti angina, karena jantung tidak menerima darah dalam jumlah yang cukup.

Salah satu alternatif untuk mengatasi hiperkolesterolemia adalah penggunaan lovastatin yang bersifat sebagai inhibitor dalam biosintesis kolesterol (Endo 1976; Cuchel *et al.* 1997). Singer *et al.* (1988) melaporkan bahwa derivat statin dapat bersifat sebagai inhibitor kompetitif untuk laju sintesis enzim HMG-KoA reduktase (3-hydroxy -3-methylglutaryl-koenzim A reduktase) yang berperan dalam biosintesis kolesterol. Mekanisme penghambatan HMG-KoA reduktase, oleh statin dapat menghalangi jalur sintesis kolesterol dalam hati.

Lovastatin diketahui dihasilkan oleh beberapa mikroorganisme sebagai hasil metabolit sekunder. Metabolit sekunder dihasilkan melalui beberapa jalur, salah satu di antaranya adalah jalur poliketida. Lovastatin adalah senyawa hasil metabolit sekunder kapang yang dihasilkan melalui jalur poliketida. Kapang adalah sumber penting untuk produksi lovastatin, mevinoлин dan monacolin K (Atalla *et al.* 2007).



Indonesia merupakan salah satu negara yang sangat kaya akan keanekaragaman hayati, baik dari kelompok bakteri, jamur, tumbuhan, dan hewan (Suryanto 2009). *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) mempunyai koleksi *Aspergillus* spp. yang dikoleksi dari berbagai macam substrat di Indonesia. Hal tersebut dapat menjadi sumber daya potensial bagi Indonesia dalam memproduksi obat untuk mengatasi hiperkolesterolemia.

Penelitian disajikan dalam dua judul makalah. Makalah pertama berjudul: Produksi Lovastatin pada Kapang *Aspergillus* spp Koleksi *University of Culture Collection* (UICC), bertujuan melakukan skrining terhadap 40 strain *Aspergillus* spp. koleksi UICC dan memproduksi lovastatin serta menganalisis kimiawi dengan *Thin Layer Chromatography* (TLC) dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Makalah kedua berjudul: Pengaruh Ekstrak Lovastatin Kapang *Aspergillus* spp. Terhadap Kadar Kolesterol dalam Darah Tikus Putih (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague Dawley, bertujuan menguji pengaruh pemberian lovastatin yang dihasilkan dari *Aspergillus* spp. terpilih terhadap penurunan kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL serta peningkatan kolesterol HDL dalam darah hewan uji.

## ABSTRAK

Nama : **YANTI RAFLIYANTI**  
Program Studi : **BIOLOGI**  
Judul : **PRODUKSI LOVASTATIN PADA KAPANG**  
***Aspergillus* spp. KOLEKSI UNIVERSITY OF**  
**INDONESIA CULTURE COLLECTION (UICC)**

Lovastatin dapat berfungsi menghambat proses pembentukan kolesterol dalam hati, dengan cara penghambatan secara kompetitif terhadap sintesis enzim 3 hydroxy -3-methylglutaryl-koenzim A reduktase (HMG-KoA reduktase). Penelitian bertujuan untuk melakukan skrining kapang *Aspergillus*. spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC), fermentasi, dan analisis produksi lovastatin. Hasil skrining lovastatin dari sebanyak 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC 18 biakan (45%) positif menghasilkan lovastatin dan 22 biakan (55%) negatif. *Aspergillus flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin tertinggi dibandingkan sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih. Analisis *Thin Layer Chromatography* (TLC) menunjukkan nilai Rf sepuluh *Aspergillus* spp. hampir sama dengan standart. Analisis *High Performance Chromatography* (HPLC) mengkonfirmasi lovastatin *Asp. flavus* UICC 360 mempunyai waktu retensi sama dengan standart (13,2 menit).

### **Kata kunci:**

Biosintesis, *Candida albicans* Y-29, fermentasi, skrining, *Thin Layer Chromatography* (TLC).

## ABSTRACT

Lovastatin is an acting inhibitor of enzyme 3 hydroxy -3-methylglutaryl-coenzyme A reduktase (HMG-CoA reductase) as competitive inhibitor on biosynthesis of cholesterol. The aims of the research is for the selection, fermentation, and analysis of lovastatin from isolates mold *Aspergillus* spp. at the University of Indonesia Culture Collection (UICC). The results revealed that out of 40 cultures, 18 cultures (45%) produced lovastatin and 22 cultures (55%) were negative. *Aspergillus flavus* UICC 360 showed the highest lovastatin production compared of 10 selected cultures. *Thin Layer Chromatography* (TLC) analysis amount of 10 *Aspergillus* spp. have similarity of Rf value compared to the standard. *High Performance Chromatography* (HPLC) analysis confirmed that lovastatin *Aspergillus flavus* UICC 360 has the same retention time with the standard (13.2 minutes).

### **Key words:**

Biosynthesis, *Candida albicans* Y-29, fermentation, screening, *Thin Layer Chromatography* (TLC).

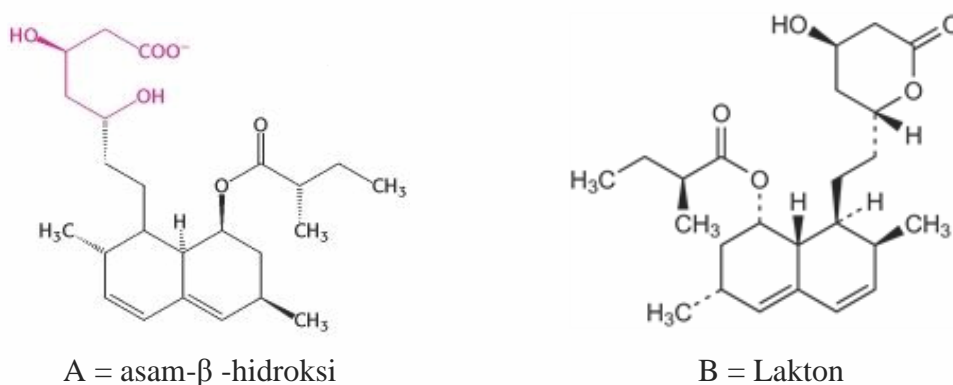
## 1. PENDAHULUAN

Lovastatin adalah hasil metabolit sekunder dari jalur poliketida yang dihasilkan oleh kapang *Asp. terreus* (Alberts *et al.* 1980; Endo 1980; Chan *et al.* 1983; Lai *et al.* 2005). Lovastatin merupakan senyawa penting untuk mengatasi penyakit hiperkolesterolemia karena aktivitasnya mampu menghambat hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktase, yang berfungsi sebagai katalis dalam biosintesis kolesterol (Alberts *et al.* 1980).

HMG Ko-A reduktase adalah enzim utama yang akan mengubah HMG KoA menjadi mevalonat. HMG KoA reduktase akan memilih berikatan dengan lovastatin pada saat konsentrasi lovastatin lebih tinggi daripada konsentrasi HMG KoA, sehingga proses pembentukan mevalonat tidak terjadi dan akibatnya proses pembentukan kolesterol terhambat (Tobert 2003).

Lovastatin terdapat dalam dua bentuk yaitu asam- $\beta$ -hidroksi dan lakton (Gambar 1.1). Fermentasi menghasilkan lovastatin dalam bentuk asam- $\beta$ -hidroksi (asam mevalonat) sedangkan sebagai obat, lovastatin merupakan bentuk lakton yang tidak aktif (mevinolin). Di dalam tubuh (*in vivo*) lovastatin diabsorpsi dari saluran gastrointestinal kemudian dibawa ke organ hati. Dalam organ hati lovastatin dalam bentuk lakton kembali dihidrolisis menjadi bentuk asam- $\beta$ -hidroksi yang aktif (Samiee *et al.* 2003).

Lovastatin bersifat semi polar, tidak larut dalam air tetapi larut baik dalam etanol, metanol, asetonitril, etil asetat dan kloroform.



Gambar 1.1: Struktur kimia lovastatin dalam bentuk A. asam- $\beta$ -hidroksi dan B. Lakton (Sumber: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh kapang dengan struktur kimia yang kompleks disintesis melalui jalur poliketida (Hassan *et al.* 2001).

Lovastatin, monacolin J, monacolin L, dan mevastatin dapat dihasilkan oleh berbagai jenis kapang seperti: *Monascus ruber*, *Penicillium brevicompactum*, dan *Asp. terreus* (Alberts *et al.* 1980; Hassan *et al.* 2001; Samiee *et al.* 2003).

Poliketida hasil metabolisme sekunder pada mikroorganisme diproses melalui biosintesis asam lemak yang memungkinkan terjadinya reaksi reduksi atau dehidrasi pada langkah-langkah biosintesis tertentu sehingga menghasilkan berbagai macam senyawa penting dalam bidang farmakologi.

Penelitian mengenai jalur biosintesis lovastatin dari *Asp. terreus* menghasilkan kesimpulan bahwa, lovastatin berasal dari dua rantai poliketida berbeda yang digabungkan oleh ikatan ester. Poliketida ini disintesis dan dikatalis oleh aktivitas beberapa enzim yang disebut *Poliketide Synthases* (Hendrickson *et al.* 1999).

Pada biosintesis lovastatin terdapat dua tipe poliketida sintase yaitu: *iterative nonaketide lovastatin synthase* (LNKS) dan *dihydromonacolin L diketide synthase lovastatin noniterative* (LDKS) kedua enzim tersebut bertanggung jawab dalam proses pembentukan lovastatin dari poliketida. LNKS ditambah satu protein tambahan (LovC) dibutuhkan untuk proses pertumbuhan rantai poliketida. Enzim LDKS berinteraksi dengan transesterase tambahan (LovD) menentukan pembentukan *2-methylbutyrate* (Kennedy *et al.* 1999).

Mikroorganisme dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diinginkan jika ditumbuhkan pada kondisi tertentu. Setelah inokulasi pertumbuhan mikroorganisme akan melalui beberapa tahap, pertama adalah fase lag yaitu masa penyesuaian sel-sel dengan lingkungan. Pada fase ini terjadi proses pembentukan enzim-enzim untuk mengurai substrat. Selanjutnya pertumbuhan sel secara bertahap meningkat maksimum yang disebut sebagai fase eksponensial. Pada awal fase tersebut enzim sudah dapat dipanen sedangkan biomassa dan senyawa lain yang tidak diperlukan lagi oleh sel dapat dipanen pada akhir fase tersebut. Berikutnya adalah fase stasioner ketika jumlah sel yang hidup dan jumlah sel yang mati seimbang. Beberapa senyawa metabolit sekunder dapat dipanen pada fase tersebut. Terakhir adalah fase kematian yang ditandai

dengan penurunan jumlah sel yang hidup dan peningkatan jumlah sel yang mati (Gandjar *et al.* 1992).

Desain medium fermentasi sangat penting untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang diharapkan. Proses pembentukan senyawa metabolit sekunder lovastatin dapat dilakukan dengan menggunakan metode fermentasi kultur terendam (*batch submerged fermentation*). Melalui cara tersebut penggunaan media lebih efisien, jenis dan konsentrasi komponen dalam media cair lebih mudah diatur agar mencapai kondisi optimum pertumbuhan (Nauli *et al.* 2006).

Menurut Atalla *et al.* (1999) peningkatan produktivitas sel dalam skala besar pada umumnya berasal dari pengembangan strain unggul juga pasokan nutrisi dalam medium. Atalla *et al.* (2008) melaporkan bahwa *Asp. terreus* J9 adalah biakan terbaik untuk memproduksi mevinolin yaitu 148.66 mg/L pada medium *Dox-rice* dengan pH 6,5. Peningkatan atau pengurangan pH dapat menurunkan produksi mevinolin. Lamanya masa inkubasi dan ammonium sulphate dalam medium sebagai sumber sulfur dan nitrogen berpengaruh terhadap peningkatan produksi mevinolin. Produksi maksimum diperoleh setelah 36 jam masa inkubasi, 400 rpm, pada suhu 28°C.

Penelitian Hassan *et al.* (2001) melaporkan bahwa produktivitas lovastatin tiga kali lipat lebih tinggi diperoleh dengan menggunakan medium glukosa dan glutamat, dibandingkan pertumbuhan pada medium kompleks dengan glukosa, susu *peptonized*, dan yeast ekstrak. Lopez *et al.* (2003) melaporkan bahwa produksi lovastatin dan biomassa mikroorganisme oleh *Asp. terreus* (ATCC 20542) dipengaruhi oleh jenis karbon dan sumber nitrogen yang digunakan dan perbandingan C : N dalam medium.

Metode skrining lovastatin yang banyak digunakan adalah *Thin Layer Chromatography* (TLC) selanjutnya dikonfirmasi dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Penelitian skrining lovastatin dilaporkan oleh Samiee *et al.* (2003) terhadap sebanyak 110 isolat fungi terdiri dari 22 genera dari *Persian Type Culture Collection* (PTCC). Hasil penelitian menunjukkan bahwa 4 genera yaitu: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* dan *Acremonium* dapat menghasilkan lovastatin dan 18 genera lainnya tidak menghasilkan. Skrining

menggunakan TLC menunjukkan 49 isolat positif, setelah dikonfirmasi dengan HPLC 31 isolat dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa lovastatin antara lain: *Asp. terreus* (55 mg/L), *Asp. parasiticus* (4,5 mg/L), *Asp. flavus* (9,0 mg/L). Di antara isolat yang diketahui dapat memproduksi lovastatin, *Asp. terreus* merupakan isolat terbaik menghasilkan lovastatin sebanyak 55 mg/L sedangkan strain lain hanya menghasilkan lovastatin kurang dari 20 mg/L.

Ferron *et al.* (2005) juga melaporkan skrining menggunakan metode pengamatan zona bening terhadap lovastatin produksi dari *Asp. terreus* yang telah diberi perlakuan mutasi secara kimawi dengan *methanesulphonic acid ethyl ester* (EMS) dengan khamir *C. albicans* sebagai mikroorganisme uji. Kaur *et al.* (2009) melakukan skrining dan seleksi lovastatin terhadap 134 fungi yang diisolasi dari tanah. Hanya 38 isolat menghasilkan lovastatin dengan berbagai variasi konsentrasi. Kumar *et al.* (2000) melakukan skrining terhadap mutan *Asp. terreus* menggunakan metode *agar plug* yang menunjukkan adanya zona bening terhadap kapang *Neurospora crassa*.

Berdasarkan uraian di atas, pengembangan penelitian dalam mengusahakan produksi lovastatin sebagai hasil metabolit sekunder dari kapang *Aspergillus* spp. terus dilakukan. Hal tersebut disebabkan karena besarnya potensi lovastatin sebagai salah satu alternatif dalam mengatasi hiperkolesterolemia. Penelitian yang dilakukan meliputi metode fermentasi, komposisi nutrisi dalam medium, metode skrining dan isolat unggul untuk produksi lovastatin.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan skrining, fermentasi, ekstraksi dan analisis produksi lovastatin *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC). Penelitian tentang pemanfaatan mikroorganisme koleksi UICC dalam *bioprospecting* belum banyak dilakukan, sehingga perlu dilakukan pencarian isolat potensial yang dapat digunakan dalam bidang industri, pertanian, dan kesehatan.

## 1.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Reproduksi dan Perkembangan, Departemen Biologi, Laboratorium Kimia Analis, Departemen Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia dan Balitro Bogor, pada Agustus 2009 – April 2010.

## 1.2 ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA

### 1.2.1 ALAT

Alat-alat dalam penelitian yang digunakan antara lain: autoklaf (Hirayama model HL 36 AE), autoklaf kecil (Hirayama), mikroskop (Olympus), oven (Heraeus Instruments), timbangan digital (Acculab model 121), vortex (Maxi Mix II Thermolyne), transfer box, Water Bath (Rhiko Shaker) dan sentrifuse (Labofuge), TLC pelat alumunium pralapis Silika Gel E.Merck 60 F<sub>254</sub> ukuran 20 x 20 cm<sup>2</sup> ketebalan 0.2 mm, TLC Scanner CAMAG 3, HPLC (Hitachi). Alat-alat gelas dan alat pendukung antara lain yang digunakan: tabung reaksi, cawan petri, labu Erlenmeyer, gelas ukur, kaca objek, pipet *bulb*, dispenser, *colony counter*, neraca analitik (Ohaus), penangas air, kamera (Samsung), Kolom C18 (Thermo Scientific), mikropipet (Gilson), pembakar spirtus, tip biru, tip kuning.

### 1.2.2 BAHAN

#### 1.2.2.1 Mikroorganisme

Penelitian menggunakan 40 biakan *Aspergillus* spp. dan *C. albicans* UICC Y-29 koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, FMIPA-UI.

#### 1.2.2.2 Medium pertumbuhan.

Medium yang digunakan untuk peremajaan *Aspergillus* spp. adalah *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid). Medium untuk pertumbuhan *C. albicans* UICC Y-29 adalah *Yeast Malt Extract Agar* (YMA). Sedangkan dalam proses fermentasi lovastatin menggunakan *Czapek Dox Broth* (CDB).

### 1.2.2.3 Bahan Kimia

Bahan-bahan kimia yang digunakan: etil-asetat (Brataco Chem), asetonitril (Merck), Silika gel F<sub>254</sub> (Merck), diklorometan (Merck), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck), KCl (Analar), NaNO<sub>3</sub> (Merck), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (Merck), sukrosa (Britania), ekstrak yeast (Bacto) malt ekstrak (BD), pepton (Merck), lovastatin (Sigma), glukosa (Britania), agar (Britania), alkohol 70% teknis, spiritus dan akuades.

## 1.2.3 CARA KERJA

### 1.2.3.1 Pembuatan medium

#### 1.2.3.1.1 Potato Dextrose Agar (PDA)

Sesuai dengan prosedur dari Oxoid

#### 1.2.3.1.2 Yeast Malt Extract Agar (YMA)

Pembuatan 1 L YMA membutuhkan 3 g ekstrak yeast, 3 g malt ekstrak, 5 g pepton, 1 g glukosa dan 15 g agar. Bahan-bahan tersebut ditambahkan dengan akuades panas, selanjutnya dididihkan dengan kompor listrik sampai semua bahan larut dengan sempurna. Volume akhir sebesar 1L. Sterilisasi medium menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit.

#### 1.2.3.1.3 Czapek Dox Broth (CDB)

Pembuatan 1 L CDB memerlukan: 0,5 g KCl, 3 g NaNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 30 g sukrosa. Bahan-bahan tersebut ditambahkan dengan akuades panas, selanjutnya dididihkan dengan kompor listrik sampai semua bahan larut dengan sempurna. Volume akhir sebesar 1L. Sterilisasi medium menggunakan autoklaf pada suhu 121° selama 15 menit.

### 1.2.3.2 Pengamatan ulang kemurnian biakan *Aspergillus* spp. koleksi

#### UICC

Pengamatan ulang kemurnian 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC dilakukan untuk mengenal morfologi secara makroskopis maupun mikroskopis serta sifat pertumbuhan biakan *Aspergillus* spp. Pengamatan dilakukan dengan menggunakan kunci identifikasi dari Raper and Fennel (1965); Samson *et al.* (1995) dan Gandjar *et al.* (1999).



### **1.2.3.3 Peremajaan biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC**

Peremajaan 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC, dilakukan dengan memindahkan masing-masing biakan ke dua tabung reaksi berisi medium PDA. Satu sebagai *stock culture* dan yang lain sebagai *working culture*. Masa inkubasi berlangsung selama 7 hari pada suhu ruang (26 - 29°C).

### **1.2.3.4 Skrining kemampuan *Aspergillus* spp. dalam menghasilkan lovastatin dengan metode bioassay *Candida albicans* Y-29 (Ferron et al. 2005).**

#### **1.2.3.4.1 Persiapan Kapang *Aspergillus* spp.**

Inokulasi biakan *Aspergillus* spp. menggunakan metode titik. Spora dan miselium diletakkan dalam cawan petri yang berisi 15 ml, medium PDA sebanyak tiga titik, dan selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang (26 - 29°C) selama 7 hari (Lampiran 1.1).

#### **1.2.3.4.2 Persiapan *Candida albicans* UICC Y-29**

*Candida albicans* diinokulasi menggunakan metode *streak* pada tabung berisi 5 ml medium YMA miring. Masa inkubasi berlangsung selama 18 jam pada suhu ruang (26 – 29°C). Inokulum dibuat dengan cara menambahkan 5 ml H<sub>2</sub>O steril ke dalam biakan, lalu mengeriknya dengan ose, dan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Inokulum dengan konsentrasi  $5-7 \times 10^7$  cfu/ml sebanyak 200 µl dimasukkan ke dalam tabung berisi 15 ml medium YMA dengan suhu 50°C, kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Selanjutnya medium tersebut dituang ke dalam cawan petri berdiameter 90 mm, dan dibiarkan sampai mengeras (Lampiran 1.2).

#### **1.2.3.4.3 Total Plate Count (TPC) *Candida albicans* Y-29**

*Candida albicans* diinokulasi menggunakan metode *streak* pada tabung berisi 5 ml medium YMA miring. Masa inkubasi berlangsung selama 18 jam pada suhu ruang (26 – 29°C). Inokulum dibuat dengan cara menambahkan 5 ml H<sub>2</sub>O steril ke dalam biakan, lalu mengeriknya dengan ose, dan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Selanjutnya inokulum tersebut diambil sebanyak 1 ml dengan mikropipet, dan dimasukkan ke dalam tabung berisi 9 ml H<sub>2</sub>O steril sebagai pengenceran  $10^{-1}$ , lalu di homogenkan dengan vortex selama 30 detik. Hal yang sama dilakukan sampai dengan pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  dan  $10^{-9}$ . Inokulum

dari tiga pengenceran terakhir masing-masing diambil sebanyak 100 µL dengan mikropipet, lalu dituang ke dalam cawan petri berisi 15 ml medium YMA, masing-masing dengan 3 kali pengulangan. Setelah itu diratakan dengan spatel *Dryglaski* steril, dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang (26 - 29°C). Jumlah sel per 1 mL sampel dihitung berdasarkan Gandjar *et al.* (1992).

$$\text{Jumlah CFU/mL} = \frac{\text{Jumlah rata-rata koloni}}{\text{Volume inokulum X faktor}}$$

#### **1.2.3.4.4 Ekstraksi Lovastatin untuk skrining (Ferron *et al.* 2005).**

Ekstraksi lovastatin dari setiap koloni *Aspergillus* spp. berumur 7 hari dilakukan dengan mengambil dua potongan koloni beserta medium menggunakan *cork borer* diameter 10 mm, lalu memasukkan potongan tersebut ke dalam tabung eppendof. Selanjutnya ditambahkan 500 µL etil asetat, dan diinkubasi dalam *water bath* dengan suhu 50°C selama 15 menit. Selama masa inkubasi dikocok setiap interval waktu 2 menit. Terakhir disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit.

#### **1.2.3.4.5 Skrining dengan metode paper disk (Ferron *et al.* 2005).**

Skrining metode paper disk diawali dengan membagi cawan petri berisi biakan *C. albicans* Y-29 dalam 6 juring, Pada setiap juring diletakkan paper disk diameter 10 mm. Selanjutnya 40 µL ekstrak lovastatin dari masing-masing biakan *Aspergillus* spp. diteteskan ke dalam paper disk. Paper disk kontrol negatif berisi etil-asetat, kontrol positif berisi 40 µL kandistatin dengan konsentrasi 100 unit/µL. Masa inkubasi berlangsung selama 18 jam pada suhu ruang (26 - 29°C). Diameter zona bening yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong (Lampiran 1.3).

#### **1.2.3.5 Fermentasi lovastatin dari *Aspergillus* spp. potensial (Modifikasi Atalla *et al.* 2008)**

##### **1.2.3.5.1 Persiapan inokulum**

Sepuluh biakan *Aspergillus* spp. yang berpotensi menghasilkan lovastatin, diinokulasi dengan metode *streak* ke dalam tabung reaksi berisi 5 ml medium PDA. Masa inkubasi berlangsung selama 7 hari pada suhu ruang (26 – 29°C). Selanjutnya pembuatan inokulum, dengan menambahkan 5 ml akuades steril, lalu

mengeriknya dengan ose. Terakhir dihomogenkan menggunakan vortex selama 30 detik (Lampiran 1.4).

#### **1.2.3.5.2 Fermentasi lovastatin**

Fermentasi lovastatin menggunakan Erlenmeyer 250 ml yang berisi 50 ml medium CDB pada pH 6,5. Pertama melakukan sterilisasi medium dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Medium didinginkan pada suhu ruang, kemudian 1 ml inokulum ( $3,5 - 4 \times 10^7$  cfu/ml) ditambahkan ke dalam Erlenmeyer berisi CDB. Masa inkubasi berlangsung selama 48 jam pada suhu 26–29°C, dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan pengocokan 100 rpm.

#### **1.2.3.5.3 Ekstraksi Lovastatin**

Setelah fermentasi, biakan difiltrasi menggunakan kertas saring (Whatman no.1). Lalu asam sulfat 2 N ditambahkan ke dalam filtrat sampai mencapai pH 3, sementara itu miselium dihomogenkan. Setelah itu filtrat dan miselium digabungkan kembali. Proses ekstraksi menggunakan corong pemisah dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstraksi menggunakan etil-asetat dalam jumlah yang sama dengan kultur. Setelah pengeringan dengan evaporator, diperoleh lovastatin dalam bentuk asam-β-hidroksi terbuka (Lampiran 1.5).

#### **1.2.3.5.4 Total Plate Count (TPC) *Aspergillus* spp.**

*Total Plate Count* (TPC) kapang *Aspergillus* spp. berumur 7 hari dimulai dengan menambahkan 5 ml H<sub>2</sub>O steril ke dalam biakan, lalu mengeriknya dengan ose dan dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Pengenceran  $10^{-1}$  dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi spora menggunakan mikropipet, dan memasukkannya ke dalam tabung berisi 9 ml H<sub>2</sub>O steril lalu dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Pengenceran  $10^{-2}$  dilakukan dengan mengambil 1 ml hasil pengenceran  $10^{-1}$  dan dituang ke dalam tabung berisi 9 ml H<sub>2</sub>O steril lalu dihomogenkan dengan vortex selama 30 detik. Hal yang sama dilakukan sampai dengan dengan pengenceran  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  dan  $10^{-9}$ . Selanjutnya 100 µL suspensi spora diambil dari tiga pengenceran terakhir dengan mikropipet, lalu dituang ke dalam cawan petri berisi 15 ml medium PDA. Setelah itu meratakannya dengan *spatel Dryglaski* steril. Masa inkubasi berlangsung selama 48 jam. Terakhir menghitung jumlah koloni pada masing-masing pengenceran.. Setiap

pengenceran dilakukan 3 kali pengulangan. Jumlah spora per ml sampel dihitung berdasarkan Gandjar *et al.* (1992).

#### **1.2.3.5.5 Analisis kadar lovastatin dengan *Thin Layer Chromatography* (TLC) (Samiee *et al.* 2003).**

Analisis kualitatif kadar lovastatin menggunakan metode *Thin Layer Chromatography* (TLC). Silika gel diaktifkan dengan cara mengeringkannya pada suhu 30°C selama 10 menit. Selanjutnya masing-masing sampel dilarutkan dalam 1 mL methanol, lalu 5µL sampel dan standart ditotolkan dalam pelat dan dikembangkan dalam bejana berisi larutan pengembang. Larutan tersebut berupa campuran diklorometan dan etil-asetat dengan perbandingan 7 : 3.

Penotolan dilakukan pada jarak 2 cm dari bawah, pinggir kiri dan pinggir kanan dengan jarak antar totolan 2 cm. Lalu setelah larutan pengembang berhenti bergerak pelat diangkat dari bejana kemudian dikering anginkan selama 15 menit. Hasil TLC dilihat di bawah sinar ultra violet pada  $\lambda$  282 nm. Nilai Rf ditentukan dari noda-noda yang muncul pada kromatogram dengan cara menghitung perbandingan antara jarak tempuh oleh suatu noda dengan jarak tempuh larutan pengembang, diukur dari titik penotolan (Aryantha 2004). Analisis kadar secara kuantitatif, membaca pelat TLC dengan alat *TLC-Scanner CAMAG 3* yang dapat mengukur kekuatan pendaran noda berdasarkan nilai absorbansinya berbanding lurus dengan kadarnya (Lampiran 1.6).

#### **1.2.3.5.6 Analisis kadar lovastatin dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (Samiee *et al.* 2003).**

Keberadaan lovastatin tertinggi hasil TLC dikonfirmasi menggunakan metode HPLC. Lovastatin diekstraksi menggunakan pelarut asetonitril. Pembuatan pelarut dengan cara menambahkan satu gram sampel dengan 2 ml asetonitril dan 0,1 ml asam fosfat 0,1 %, dan diinkubasi selama 30 menit. Selanjutnya larutan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 10 menit. Kemudian supernatan disuntikkan ke kolom HPLC sebanyak 1 µg/ml. Kondisi HPLC yang digunakan ialah kolom C-18 (250 cm x 46 cm), pelarut asetonitril dan asam fosfat 60:40 (v/v), kecepatan alir sebesar 1,5 ml/menit, menggunakan detektor ultraviolet (UV) pada  $\lambda$  235 nm, suhu kolom 30°C .

## 2. HASIL DAN PEMBAHASAN

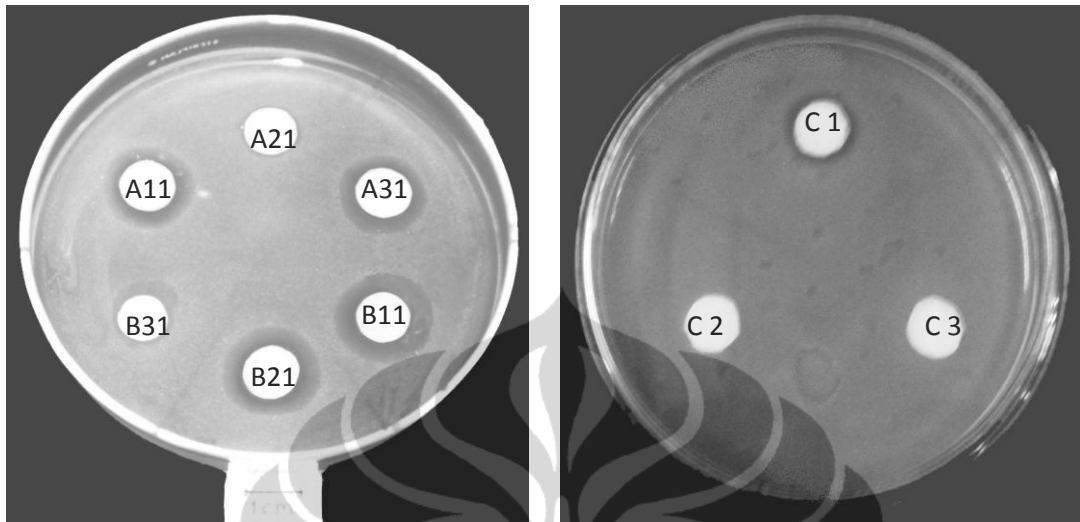
### 2.1 Pengamatan makroskopis dan mikroskopis *Aspergillus* spp.

Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis dari 40 kapang *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* (UICC) dapat dilihat pada Lampiran I.7. Pengamatan makroskopis dan mikroskopis dari 40 kapang *Aspergillus* spp. tidak bertujuan untuk identifikasi karena itu hasil pengamatan berupa penjelasan morfologis dari 40 kapang *Aspergillus* spp. tidak sampai pada kesimpulan mengenai nama spesies dari kapang tersebut, kecuali untuk beberapa spesies koleksi UICC yang sudah diidentifikasi. Hasil pengamatan mengacu pada buku identifikasi: Raper and Fennell (1965); Samson *et al.* (1984); dan Gandjar *et al.* (1999). Biakan *Aspergillus* spp. diamati secara makroskopis menunjukkan perbedaan kecepatan pertumbuhan, warna koloni, permukaan koloni dan pengamatan mikroskopis menunjukkan adanya perbedaan bentuk kepala konidia, vesikel, uni/biseriate, bentuk konidia, dan warna konidia.

Koloni berwarna hitam-hitam-kecoklatan didapatkan sebanyak sepuluh biakan, antara lain: *Aspergillus* sp. Shi 12.3, *Asp. awamori*, *Asp. niger*, *Asp. foeticus*, *Asp. ficuum*, *Asp. phoenicus*, *Asp. tubingensis*, koloni berwarna kehijauan sebanyak 24 biakan, antara lain: *Aspergillus* sp Shi 10.b, *Asp. flavus*, *Asp. clavatus*, *Asp. fumigatus*, *Asp. nidulans*, *Asp. parasiticus*, koloni berwarna coklat-kekuningan, sebanyak 6 biakan antara lain: *Asp. ochareus* dan *Asp. terreus*.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa biakan *Aspergillus* spp. mampu menghasilkan metabolit sekunder misalnya: *Asp. terreus* mampu menghasilkan lovastatin, patulin, sitrinin, sitreoviridin, glioxin (Alberts *et al.* 1980; Klich 2002; Samiee *et al.* 2003). *Asp. ochraceus* menghasilkan okratoksin (Awad *et al.* 2005)

## 2.2 Skrining Lovastatin dari *Aspergillus* spp. dengan metode paper disk (Ferron *et al.* 2005)



Gambar 1.2. Gambar zona bening kontrol positif dan negatif bioassay *Aspergillus* spp. terhadap *C. albicans* UICC Y-29

Keterangan:

A. 1,2,3: *Asp. flavus* UICC 359

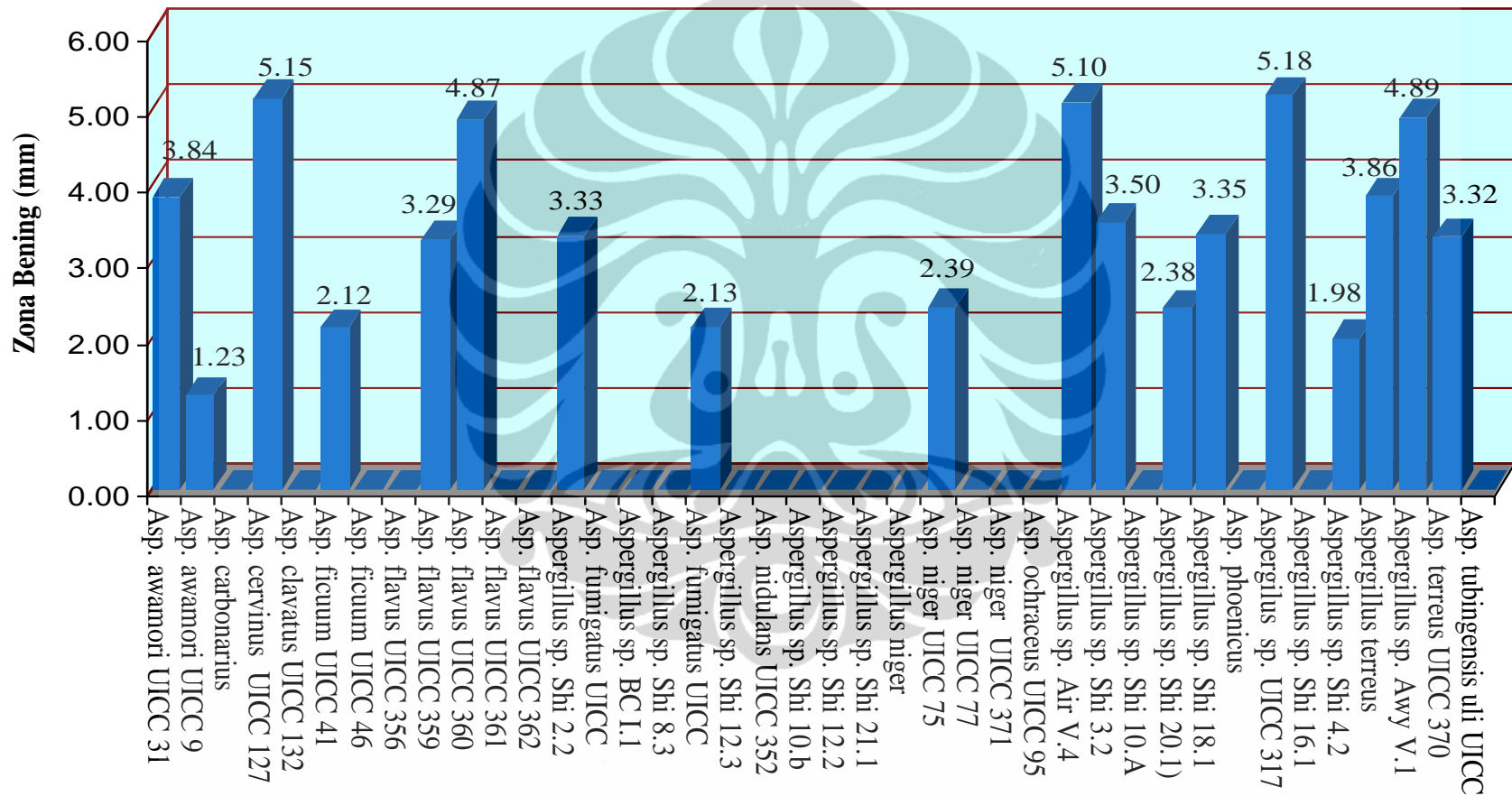
B. 1,2,3: *Asp. flavus* UICC 360

C. 1: Kontrol positif

C. 2,3: Kontrol negatif

Skrining aktivitas lovastatin 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection terhadap *C. albicans* UICC Y-29 dilakukan dengan membandingkan ukuran zona bening yang dihasilkan. Skrining menggunakan metode tersebut juga dilakukan oleh Ferron *et al.* (2005) dan Kumar *et al.* (2000).

Zona bening dihasilkan karena ekstrak lovastatin yang dimasukkan dalam paper disk (40  $\mu$ L/paper disk) berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Sebanyak 18 biakan (45%) *Aspergillus* spp. menunjukkan adanya zona bening disekitar paper disk dengan ukuran zona bening berkisar antara 1,23–5,20 mm, antara lain: *Asp. terreus*, *Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. fumigatus* UICC 358, *Asp. flavus* UICC 359 dan *Asp. flavus* UICC 360. Sebanyak 22 biakan (55%) lainnya tidak menunjukkan adanya zona bening antara lain: *Asp. ochraceus*, *Asp. niger* UICC 371, *Asp. niger* UICC 77 (Gambar 1.2 dan 1.3).



Gambar 1.3 Diagram hasil skrining aktivitas lovastatin 40 *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* terhadap *C. albicans* UICC Y-29

Perbedaan zona bening dihasilkan oleh masing-masing biakan *Aspergillus* spp. yang diujikan, zona bening terkecil 1,23 mm dihasilkan oleh *Asp. awamori* (9) dan yang paling besar 5,2 mm dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. UICC 317. Hal tersebut disebabkan adanya perbedaan dari masing-masing biakan yang diujikan, sehingga menyebabkan perbedaan sifat biologi dari masing-masing biakan.

Ferron *et al.* 2005 menyatakan bahwa faktor yang mempengaruhi keberhasilan metode skrining dengan paper disk adalah ketebalan dari agar yang akan mempengaruhi difusi dari ekstrak lovastatin, konsentrasi atau jumlah sel *C. albicans* yang diujikan dan lamanya waktu inkubasi. Menurut Crueger dan Crueger (1984) ketidakmampuan beberapa biakan *Aspergillus* spp. dalam penghambatan *C. tropicalis* kemungkinan disebabkan karena biakan tersebut tidak menghasilkan metabolit sekunder yang bersifat anti khamir atau hanya menghasilkan dalam jumlah sedikit sehingga tidak mampu menghambat pertumbuhan.

Lovastatin yang ada di alam dapat berupa asam- $\beta$ -hidroksi dan bentuk lakton, dari dua bentuk tersebut asam- $\beta$ -hidroksi merupakan bentuk yang aktif (Kumar *et al.* 2000). Ekstrak etil-asetat lovastatin pada pengujian tersebut dalam bentuk asam- $\beta$ -hidroksi, bersifat antifungi.

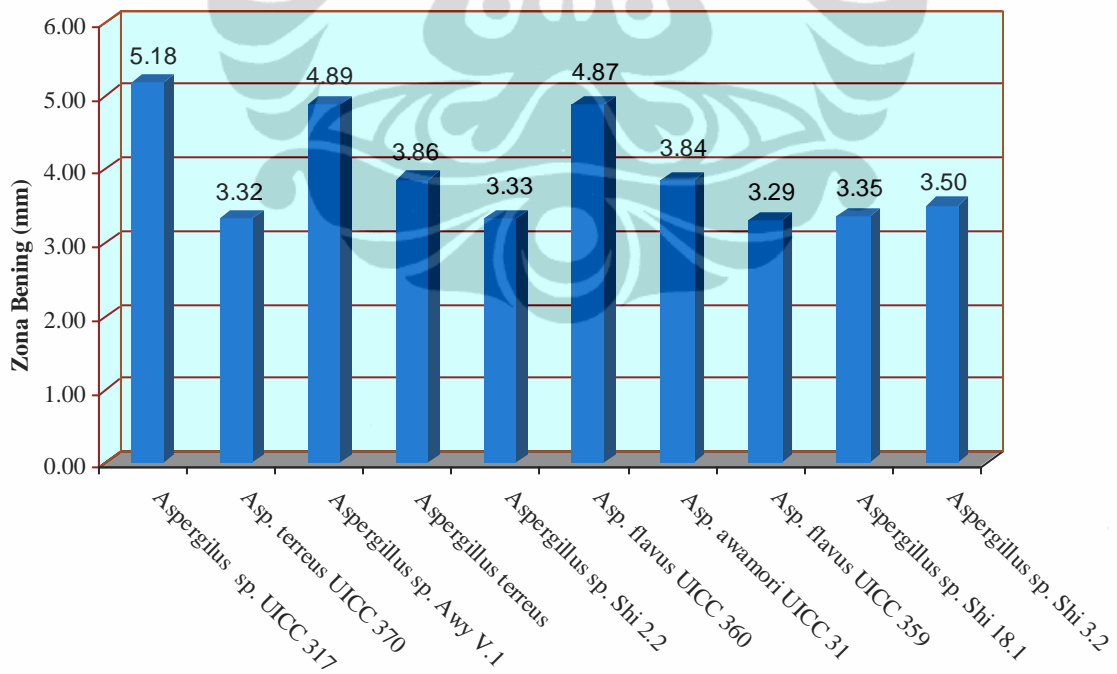
Membran sel *C. albicans* terdiri dari lapisan fosfolipid ganda. Membran sterol pada dinding sel memegang peranan penting sebagai target antimikotik dan tempat bekerjanya enzim-enzim yang berperan dalam sintesis dinding sel.

Mekanisme penghambatan mikosin (zat anti jamur) terhadap pertumbuhan khamir disebabkan oleh karena (1) mikosin berikatan langsung dengan sterol yang terdapat dalam membran khamir, sehingga membuat bocornya membran dan berakibat kehilangan senyawa intraselular (2) mikosin bergabung dengan RNA yang kemudian menghambat sintesis protein dan (3) mikosin menghambat sintesis ergosterol yang menyebabkan permeabilitas membran khamir meningkat sehingga membran rusak (Ganiswara *et al.* 1995).



Berdasarkan penelitian Lorenz dan Parks (1990), lovastatin sangat efektif dalam menurunkan sterol dari *Saccharomyces cerevisiae*. Lovastatin mampu menurunkan kandungan kolesteril ester dari 2,62 menjadi 0,8 µg/mg berat kering, sedangkan kandungan sterol bebas hanya mengalami penurunan dari 2,79 menjadi 2,24 µg/mg berat kering ketika medium diberikan lovastatin sebanyak 10 µg/mg berat kering. Pada konsentrasi yang lebih tinggi 100 µg/mL lovastatin hampir menghilangkan akumulasi kolesteril ester dan menurunkan konsentrasi sterol bebas sampai kurang dari 1,3 µg/mg (berat kering).

Gambar 1.3 menunjukkan sepuluh biakan terpilih yang menghasilkan zona bening lebih besar dari 3 mm, juga mempunyai kecepatan pertumbuhan hampir sama antara biakan satu dengan lainnya. *Aspergillus* sp. UICC 317 (5,2 mm), *Aspergillus* Awy V.1 (4,89 mm), *Asp. flavus* UICC 360 (4,87 mm) menghasilkan zona bening paling besar dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* UICC Y-29. Sepuluh biakan tersebut akan dianalisis kandungan senyawa lovastatinnya secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan TLC dan dikonfirmasi menggunakan analisis HPLC.



Gambar 1.4 Hasil skrining aktivitas lovastatin sepuluh *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC) terhadap *C. albicans* UICC Y-29

## 2.2 Fermentasi lovastatin terhadap sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih koleksi UICC dalam medium cair *Czapek Dox Broth* (CDB).

Perubahan pH selama fermentasi biakan sepuluh *Aspergillus* spp. koleksi UICC selama 48 jam fermentasi pada medium CDB, dengan suhu ruang (26–29°C) dan kecepatan pengocokan 100 rpm dapat dilihat pada Tabel 1.1.

Tabel 1.1 menunjukkan pH awal dan akhir setelah 48 jam fermentasi produksi lovastatin dalam medium CDB. Medium pada awal fermentasi mempunyai pH 6.5, pada akhir fermentasi terjadi penurunan pH kearah asam berkisar antara 3 sampai 6 antara lain pada medium biakan *Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. terreus*, *Asp. flavus* 360, *Asp. awamori* UICC 31, *Asp. flavus* UICC 359, *Aspergillus* sp. Shi 18.1 dan *Aspergillus* sp. Shi 3.2 sedangkan pada biakan *Asp. terreus* UICC 370, *Aspergillus* sp. AwyV.1 dan *Aspergillus* sp. Shi 2.2 terjadi kenaikan pH kearah netral.

Selama fermentasi kapang dapat mengubah pH medium. Terjadinya penurunan dan kenaikan pH selama proses fermentasi disebabkan karena kapang melakukan aktivitas pertukaran antara kation dan anion dalam medium. Adanya akumulasi senyawa organik, terutama asam glukonat, asam piruvat, asam sitrat yang dihasilkan selama metabolisme glukosa menyebabkan medium berubah menjadi asam (Griffin 1984). Adanya perubahan pH akan mempengaruhi permeabilitas membran sel dalam sistem transport ion. Kenaikan dan penurunan pH medium selama fermentasi akan menyebabkan penurunan produksi mevinolin.

Atalla *et al.* (2008) mempelajari pengaruh pH awal 6.5 untuk optimasi produksi mevinolin dari *Asp. terreus*, dilakukan pengaturan selama fermentasi pada pH 6,5, pada akhir fermentasi pH mencapai 6,1 sampai 7,15. Perubahan pH medium dalam fermentasi *Asp. flavus* tidak terlalu besar yaitu dari 6,5 menjadi 6,0 menyebabkan produksi lovastatin maksimal. Perubahan pH pada *Aspergillus* sp. UICC 317 dalam penelitian dari 6,5 menjadi 3 menyebabkan produksi lovastatin tidak maksimal sekalipun dari rendemen ekstrak dan pembentukan zona bening *Aspergillus* sp. UICC 317 memiliki nilai yang paling besar. *Aspergillus* sp. Shi 3.2 juga tidak mengalami perubahan pH yang terlalu besar dari 6,5 menjadi 6,0 tetapi jika dilihat dari data skrining dengan metode paper disk (3,50 mm) dan hasil analisis kualitatif dengan TLC ( $R_f = 0,23$ ) nampaknya senyawa

yang menyebabkan terbentuknya zona bening bukanlah senyawa lovastatin. sedangkan pada *Asp. terreus* UICC 370, *Aspergillus* sp. AwyV.1 dan *Aspergillus* sp. Shi 2.2 terjadi kenaikan pH kearah netral.

Hasil pengamatan terhadap warna medium, pembentukan hifa dan pelet selama proses fermentasi dapat dilihat pada Tabel 1.2. Pengamatan selama fermentasi dilakukan setiap 6 jam selama 48 jam. Pada pengamatan 6 jam belum terlihat adanya pertumbuhan, perubahan hanya terlihat pada warna medium yang kelihatan sedikit lebih keruh dibandingkan dengan kontrol, hifa belum terbentuk. Pada pengamatan kedua (12 jam) mulai terlihat adanya potongan-potongan hifa, dari sepuluh *Aspergillus* spp. yang difermentasi, biakan yang memperlihatkan pertumbuhan tercepat adalah 31 *Asp. Awamori*, tetapi pada akhir fermentasi besar pelet pada biakan tersebut tidak merata, permukaan pelet tidak halus dan kompak serta masih ada pelet yang terfragmentasi. Pertumbuhan paling lambat pada *Aspergillus* sp. AWy V.1. meskipun pada akhir fermentasi *Aspergillus* sp AWy V.1 menghasilkan pelet yang bulat kecil-kecil dengan permukaan halus dan kompak. Kecepatan awal pertumbuhan yang sama terlihat pada *Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. flavus* UICC 360 dan *Aspergillus* sp. Shi 18.1 meskipun pada akhir fermentasi ketiganya memperlihatkan hasil yang berbeda *Asp. flavus* UICC 360 memperlihatkan pembentukan pelet dengan permukaan yang halus dan kompak sekalipun ukuran pelet tidak merata. Ukuran pelet yang dihasilkan oleh *Aspergillus* sp. UICC 317 cukup merata dan besar-besar tetapi permukaannya y tidak halus dan tidak kompak, sedangkan pada *Aspergillus* sp. Shi 18.1 masih banyak pelet yang terfragmentasi. Pada akhir fermentasi *Aspergillus* sp. UICC 317 menghasilkan jumlah pelet terbanyak diikuti dengan *Asp. terreus*.

Menurut Judoamidjojo *et al.* (1992) pertumbuhan kapang memiliki karakteristik perpanjangan seperti rantai bercabang. Miselium dapat tumbuh memanjang dan sedikit bercabang, atau pendek dan banyak bercabang, atau dapat juga merupakan kombinasi keduanya. Hal tersebut sangat bergantung kepada kondisi fisiokimia lingkungan. Bila pertumbuhan berlangsung di permukaan medium, miselium teranyam membentuk lapisan yang tebal. Bila pertumbuhan berlangsung dalam medium, maka miselium akan lebih jarang dan dapat berbentuk pelet dengan diameter 0,1 –10 mm. Bentuk lapisan atau pelet menjadi

penting karena dapat mempengaruhi kondisi fisiokimia lingkungan. Bila produk disintesis pada bagian pusat pelet, maka profil pelet akan bulat dengan permukaan halus dan kompak. Bila sel-sel di pusat pelet mati, karena tidak mendapat nutrisi, maka profil pelet akan nampak terfragmentasi dengan permukaan yang tidak halus dan kompak. Proses fermentasi dalam penelitian ini menggunakan medium CDB dengan jumlah inokulum, suhu dan agitasi yang sama. Profil pelet yang dihasilkan berbeda antara satu biakan dengan biakan lainnya, hal tersebut kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan sifat dari setiap biakan.

Lopez *et al.* (2003) melaporkan bahwa produksi lovastatin dan biomassa mikroorganisme oleh *Asp. terreus* (ATCC 20542) dipengaruhi oleh jenis sumber karbon dan nitrogen yang digunakan dan perbandingan C : N dalam medium. Nitrogen digunakan dalam metabolisme untuk biosintesis berbagai komponen selular, seperti asam nukleat, asam amino, protein dan vitamin (Fieldman, 2001). Sumber nitrogen yang digunakan oleh kapang dapat dibedakan dua kelompok sebagai sumber nitrogen organik dan anorganik. Sumber nitrogen organik merupakan nutrisi kompleks seperti yeast ekstrak, pepton, tepung kedelai, asam amino, sumber anorganik berupa  $\text{Na}/\text{KNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ., dalam nutrisi nitrogen yang sering ditemukan dalam bentuk  $\text{NH}_3$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2$  (Madigan *et al.* 2000).

Penelitian produksi lovastatin pada *Asp. terreus* dengan menggunakan nitrogen organik dan anorganik menunjukkan glutamat dan histidin memberikan hasil yang paling tinggi, dan glutamat tidak menjadi penghambat dalam produksi lovastatin. (Hassan *et al.* 2001). Shindia (2001) melaporkan penggunaan sodium nitrat dan yeast ekstrak pada *Asp. terreus* dapat menghasilkan lovastatin maksimal. Miyake *et al.* (2006) meneliti produksi lovastatin pada *Monascus pilosus* membutuhkan nitrogen organik berupa pepton.

Tabel 1.1 Perubahan pH, rendemen ekstrak dan warna ekstrak setelah fermentasi

Hasil Fermentasi		Mikroorganisme									
		<i>Aspergillus</i> sp. UICC 317	<i>Asp. terreus</i> UICC 370	<i>Aspergillus</i> sp. Awy V.1	<i>Asp. terreus</i>	<i>Aspergillus</i> sp. Shi 2.2	<i>Asp. flavus</i> UICC 360	<i>Asp. awamori</i> UICC 3	<i>Asp. flavus</i> UICC 359	<i>Aspergillus</i> sp. Shi 18.1	<i>Aspergillus</i> sp. Shi 3.2
pH	Awal	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5	6,5
	Akhir	3,0	7,0	7,0	5,0	7,0	6,0	4,0	6,0	4,0	6,0
Rendemen ekstrak (%)		1,34	0,7	0,31	0,95	0,79	0,53	0,48	0,53	0,64	0,83
Warna		Hartal coklat	Hartal	Jingga muda	Hartal emas	Kuning	Hartal emas	Kuning jenar	Hartal rentung	Hartal emas	Hartal

.Tabel 1.2 Hasil pengamatan terhadap warna medium, warna dan jumlah pelet yang terbentuk selama proses fermentasi

Kapang	6 jam	12 jam	18 jam	24 jam	36 jam	42 jam	48 jam
<i>Aspergillus</i> sp.UICC 317	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (2+)	Medium berwarna a hartal keruh, hifa membentuk gumpalan kecil (3+)	Medium berwarna hartal, sebagian hifa membentuk gumpalan kecil, sebagian lagi fragmented (4+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet besar, sebagian lagi fragmented (5+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet besar, sebagian lagi kecil warna putih susu (6+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet besar, sebagian lagi kecil warna putih susu (6+)
<i>Asp. terreus</i> UICC 370	Medium berwarna hartal muda keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium berwarna hartal keruh, hifa membentuk gumpalan kecil warna krem (2+)	Medium berwarna kuning jernih, sebagian hifa fragmented, sebagian menempel di dinding (3+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet kecil-kecil (5+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet kecil-kecil warna putih susu, banyak menempel (6+)	Medium berwarna hartal, hifa membentuk pelet kecil-kecil warna putih susu, banyak menempel (6+)

<i>Aspergillus</i> sp. Awy V.1	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium berwarna hartal keruh, hifa membentuk gumpalan kecil (2+)	Medium berwarna kuning jernih, sebagian hifa fragmented kecil dan halus (2+)	Medium berwarna kuning jernih, hifa bentuk pelet kecil-kecil halus warna krem (4+)	Medium berwarna kuning jernih, hifa pelet kecil dan halus, warna krem (4+)	Medium berwarna kuning jernih, hifa pelet kecil dan halus, warna krem (4+)
<i>Asp. terreus</i>	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium berwarna putih keruh, hifa membentuk pelet tidak bulat warna putih susu (2+)	Medium berwarna putih keruh, hifa membentuk pelet tidak bulat warna putih susu (3+)	Medium berwarna putih keruh, sebagian hifa fragmented kecil-kecil dan sebagian bentuk pelet kecil putih susu (3+)	Medium berwarna putih keruh, sebagian hifa fragmented kecil-kecil dan sebagian bentuk pelet kecil putih susu (3+)	Medium berwarna putih keruh, sebagian hifa fragmented kecil-kecil dan sebagian bentuk pelet kecil putih susu (3+)
<i>Aspergillus</i> sp. Shi 2.2	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium berwarna hartal keruh, hifa membentuk gumpalan kecil (3+)	Medium berwarna kuning keruh, hifa membentuk gumpalan warna putih susu (4+)	Medium berwarna kuning keruh, hifa membentuk gumpalan warna putih susu (4+)	Medium berwarna kuning keruh, hifa membentuk pelet dengan besar merata warna putih susu (4+)	Medium kuning keruh, hifa membentuk pelet dengan besar merata warna putih susu (4+)

<i>Asp. flavus</i> UICC 360	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (2+)	Medium berwarna kuning muda jernih, hifa warna hartal membentuk gumpalan kecil (2+)	Medium warna kuning jernih, hifa bentuk gumpalan kecil, warna krem kecoklatan (3+)	Medium berwarna kuning jernih, hifa membentuk pelet besar dan halus, warna hartal (5+)	Medium berwarna hartal jernih, hifa membentuk pelet besar dan kecil halus, warna hartal (6+)	Medium berwarna hartal jernih, hifa membentuk pelet besar dan kecil halus, warna hartal (6+)
31 <i>Asp. awamori</i>	Medium warna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (3+)	Medium kuning muda jernih, hifa hartal bentuk gumpalan kecil (4+)	Medium kuning jernih, hifa bentuk gumpalan kecil, warna coklat jangat (4+)	Medium kuning jernih, hifa bentuk pelet kecil dan besar warna coklat jangat (5+)	Medium putih jernih, hifa bentuk pelet kecil dan besar warna coklat jangat (6+)	Medium putih jernih, hifa bentuk pelet kecil dan besar warna coklat jangat (6+)
<i>Asp. flavus</i> UICC 359	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium berwarna coklat jangat jernih, hifa hartal krem bentuk gumpalan kecil (2+)	Medium putih keruh, hifa membentuk gumpalan kecil, warna krem (3+)	Medium putih keruh, hifa membentuk pelet kecil, warna krem susu (5+)	Medium putih keruh, hifa membentuk pelet kecil, warna krem/putih susu (6+)	Medium putih keruh, hifa membentuk pelet kecil, warna krem/putih susu (6+)



<i>Aspergillus</i> sp. Shi 18.1	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (2+)	Medium berwarna hartal keruh, hifa warna krem bentuk gumpalan kecil (2+)	Medium putih keruh hifa bentuk gumpalan kecil, warna putih susu (3+)	Medium putih keruh hifa bentuk pelet fragmented warna putih susu (5+)	Medium putih keruh hifa bentuk pelet fragmented warna putih keruh (6+)	Medium putih keruh hifa bentuk pelet fragmented warna putih keruh (6+)
<i>Aspergillus</i> sp. Shi 3.2	Medium berwarna hartal keruh, belum terbentuk pelet	Medium berwarna hartal keruh, potongan hifa (+)	Medium warna putih kekuningan jernih, hifa hartal coklat bentuk (2+)	Medium kuning jernih hifa fragmented, warna coklat jangat (3+)	Medium kuning jernih hifa bentuk pelet kecil dan besar, warna coklat jangat (4+)	Medium kuning jernih hifa bentuk pelet kecil dan besar, warna coklat jangat (6+)	Medium kuning jernih hifa bentuk pelet kecil dan besar, warna coklat jangat (6+)

Ket. Gambar: + : sangat sedikit

2+ : sedikit

3+: sedang

4+: banyak

5+: banyak sekali

6+: sangat banyak sekali

Medium CDB yang digunakan dalam penelitian menggunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat ( $\text{PO}_4$ )<sup>-3</sup>, di alam fosfat dalam bentuk organik dan anorganik diperlukan oleh kapang terutama dalam proses sintesis asam nukleat dan fosfolipid (Madigan *et al.* 2000). Lopez *et al.* (2004) juga menggunakan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat pada produksi lovastatin dari *Asp. terreus*. Sayyad *et al.* (2006) juga melaporkan penggunaan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  untuk mengoptimasi produksi lovastatin pada *Monascus purpureus* MTCC 369.

Dalam penelitian tidak dilakukan optimalisasi medium untuk meningkatkan produksi lovastatin karena tujuan penelitian adalah melakukan skrining terhadap potensi *Aspergillus* spp. koleksi UICC dalam menghasilkan lovastatin. Perbandingan C : N dalam medium CDB dengan sukrosa sebagai sumber karbon,  $\text{NaNO}_3$  sebagai sumber nitrogen anorganik, yang digunakan dalam penelitian, belum memungkinkan untuk menghasilkan senyawa lovastatin secara maksimal.

### **2.3 Analisis kualitatif senyawa lovastatin pada sepuluh *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).**

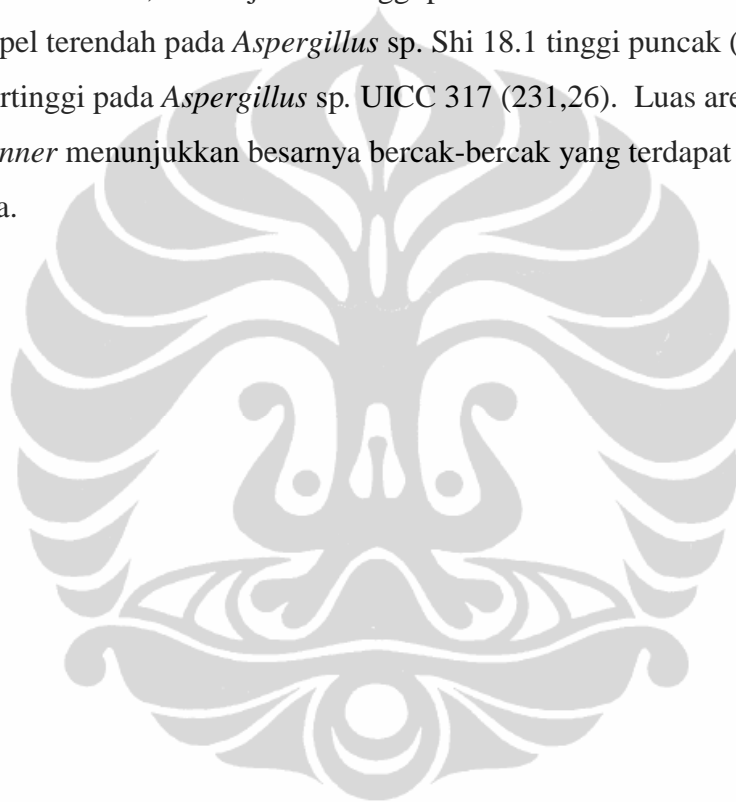
*Thin Layer Chromatography* (TLC) *Scanner* merupakan alat yang digunakan untuk menganalisis secara kualitatif maupun kuantitatif keberadaan suatu senyawa. Analisis secara kualitatif digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya senyawa lovastatin pada sepuluh sampel *Aspergillus* spp. koleksi UICC, dengan melihat kesamaan nilai *Relatif mobility* (Rf), yaitu jarak relatif yang ditempuh oleh komponen dengan eluen standart dan sampel (Boyer 1986).

Sampel dengan nilai Rf sama menunjukkan bahwa hasil ekstraksi lovastatin dengan etil asetat tersebut berupa senyawa lovastatin, sedangkan yang mempunyai nilai Rf lebih rendah atau lebih tinggi kemungkinan masih ada senyawa lain yang terkandung dalam ekstrak, karena perbedaan dari masing-masing isolat *Aspergillus* spp. terpilih yang diuji untuk menghasilkan lovastatin. Nilai Rf untuk masing-masing sampel dan standart dapat dilihat pada Gambar 1.5.

Penelitian penggunaan TLC untuk melakukan skrining terhadap produksi lovastatin juga dilakukan pada genus *Pleurotus* terutama *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus saca* dan *Pleurotus sapidus* (Cimerman *et al.* 2006). Lee *et al.* (2006) melaporkan bahwa untuk mendeterminasi adanya lovastatin pada *Pleurotus*

*ostracesus*, dengan menggunakan TLC dari ekstrak badan buah dan miselium menunjukkan nilai Rf yang sama dengan standart yaitu 0,46. Samiee *et al.* (2003) juga menggunakan TLC dan HPLC untuk melakukan uji produksi lovastatin sebanyak 110 isolat kapang, dengan menggunakan eluen diklorometan: etil-asetat (70:30).

Gambar 1. 6 menunjukkan gambar 3-dimensi dari lovastatin yang dihasilkan oleh sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih, dianalisis menggunakan TLC Scanner CAMAG 3, menunjukkan tinggi puncak kurva standar lovastatin (216,86), sampel terendah pada *Aspergillus* sp. Shi 18.1 tinggi puncak (117,04) dan puncak tertinggi pada *Aspergillus* sp. UICC 317 (231,26). Luas area pada hasil TLC scanner menunjukkan besarnya bercak-bercak yang terdapat di dalam lempeng silika.



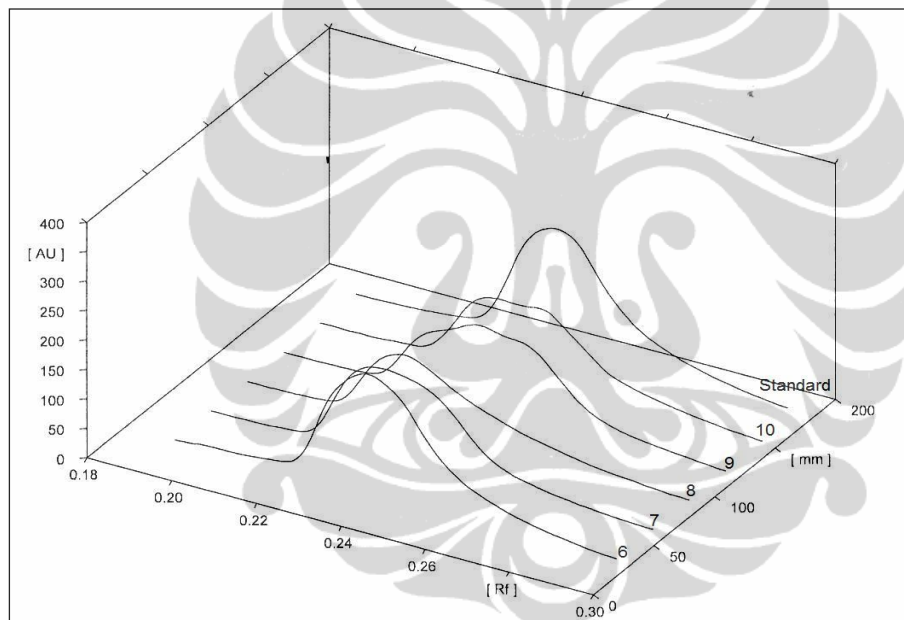
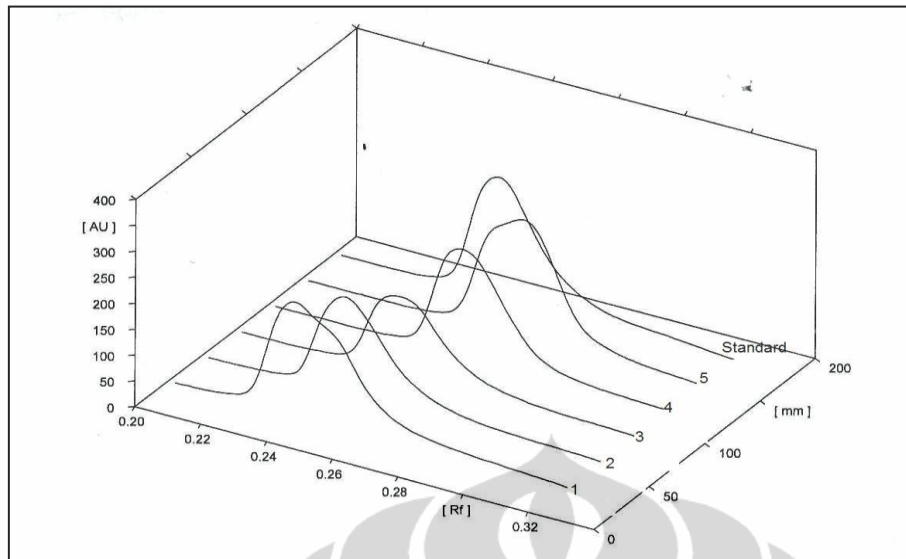
winCATS Planar Chromatography Manager								
Substance: lovastatin @ 282 nm								
Regression via height:		Single level	$Y = 0 + 1.702 * X$			$r = 0.00000$ sdv = 0.00		
Regression via area:		Single level	$Y = 0 + 101.1 * X$			$r = 0.00000$ sdv = 0.00		
Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.24	127.40 mg	216.86		12874.49		
2	5	0.24		186.11	109.33 mg	9488.53	93.89 mg	
3	4	0.25		148.97	87.52 mg	8041.38	79.57 mg	
4	3	0.26		206.09	121.07 mg	10022.26	99.18 mg	
5	2	0.27		227.41	133.60 mg	12228.95	121.01 mg	
6	1	0.25		231.26	135.86 mg	11675.82	115.54 mg	

winCATS Planar Chromatography Manager								
Substance: lovastatin @ 282 nm								
Regression via height:		Single level	$Y = 0 + 1.571 * X$			$r = 0.00000$ sdv = 0.00		
Regression via area:		Single level	$Y = 0 + 92.49 * X$			$r = 0.00000$ sdv = 0.00		
Track	Vial	Rf	Amount	Height	X(Calc)	Area	X(Calc)	SampleID/Remark
1	1	0.24	127.40 mg	200.17		11783.04		
2	10	0.23		150.41	95.73 mg	9838.30	106.37 mg	
3	9	0.23		117.04	74.49 mg	7335.67	79.31 mg	
4	8	0.24		136.12	86.64 mg	9831.00	106.29 mg	
5	7	0.23		123.57	78.65 mg	3623.34	39.18 mg	
6	6	0.24		202.60	128.95 mg	11429.74	123.58 mg	

Gambar 1.5 :  
 A. Nilai Rf, tinggi dan luas area standart (track1), sampel 1 – 5 *Aspergillus* spp. koleksi UICC  
 B. Nilai Rf, tinggi dan luas area standart (track1), sampel 6 – 10 *Aspergillus* spp. koleksi UICC

Keterangan :

1. <i>Aspergillus</i> sp. UICC 317	6. <i>Asp. flavus</i> UICC 360
2. <i>Asp. terreus</i> UICC 370	7. <i>Asp. awamori</i> UICC 31
3. <i>Aspergillus</i> sp. AWy V1	8. <i>Asp. flavus</i> UICC 359
4. <i>Asp. terreus</i>	9. <i>Aspergillus</i> sp. Shi. 18.1
5. <i>Aspergillus</i> sp. Shi 2.2	10. <i>Aspergillus</i> sp. Shi. 3.2



Gambar I.6. Diagram 3-D dari kurva densitas bercak-bercak lovastatin sepuluh *Aspergillus* spp. Koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).

- Keterangan :
- |                                   |                                     |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 1 <i>Aspergillus</i> sp. UICC 317 | 6. <i>Asp. flavus</i> UICC 360      |
| 2. <i>Asp. terreus</i> UICC 370   | 7. <i>Asp. awamori</i> UICC 31      |
| 3. <i>Aspergillus</i> sp. AWy V1  | 8. <i>Asp. flavus</i> UICC 359      |
| 4. <i>Asp. terreus</i>            | 9. <i>Aspergillus</i> sp. Shi.18.1  |
| 5. <i>Aspergillus</i> sp. Shi 2.2 | 10. <i>Aspergillus</i> sp. Shi. 3.2 |

## 2.4 Analisis kuantitatif senyawa lovastatin terhadap sepuluh *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection (UICC).

Analisis kualitatif TLC secara *spectrodensitometry* menggunakan TLC *Scanner CAMAG 3*, berdasarkan kurva kalibrasi dari standart lovastatin. Kurva kalibrasi diperoleh dari luas area gelombang setiap serial konsentrasi larutan standart, mulai dari 5 ppm sampai 25 ppm (Tabel I.4). Selanjutnya data luas area dan tinggi puncak standart lovastatin diolah dengan program *winCATS Planar Chromatography Manager*, sehingga untuk standart lovastatin diperoleh kurva kalibrasi dengan rumus garis linier berdasarkan tinggi puncak dan luas area adalah sebagai berikut: (Lampiran 1.9 dan Lampiran 1.10)

$$Y = 0 + 1.702 * X$$

$$Y = 0 + 101.1 * X$$

Koefisien korelasi (R) dari kurva kalibrasi standart lovastatin adalah 0,0000 dengan  $sdv = 0,00$ , sehingga rumus garis linier tersebut dapat digunakan untuk mencari konsentrasi senyawa lovastatin pada sampel *Aspergillus* spp. koleksi UICC. (Lampiran 1.11)

Tabel 1.3 Hasil analisis kuantitatif terhadap sepuluh *Aspergillus* spp.

Kapang	Ekstrak lovastatin mg/L
<i>Aspergillus</i> sp. UICC 317	77,6
<i>Asp. terreus</i> UICC 370	52,8
<i>Aspergillus</i> sp. Awy V.1	31
<i>Asp. terreus</i>	36,7
<i>Aspergillus</i> sp. Shi 2.2	38,5
<i>Asp. flavus</i> UICC 360	85,8
<i>Asp. awamori</i> UICC 31	9,9
<i>Asp. flavus</i> UICC 359	48,5
<i>Aspergillus</i> sp. Shi 18.1	39,5
<i>Aspergillus</i> sp. Shi 3.2	69,7

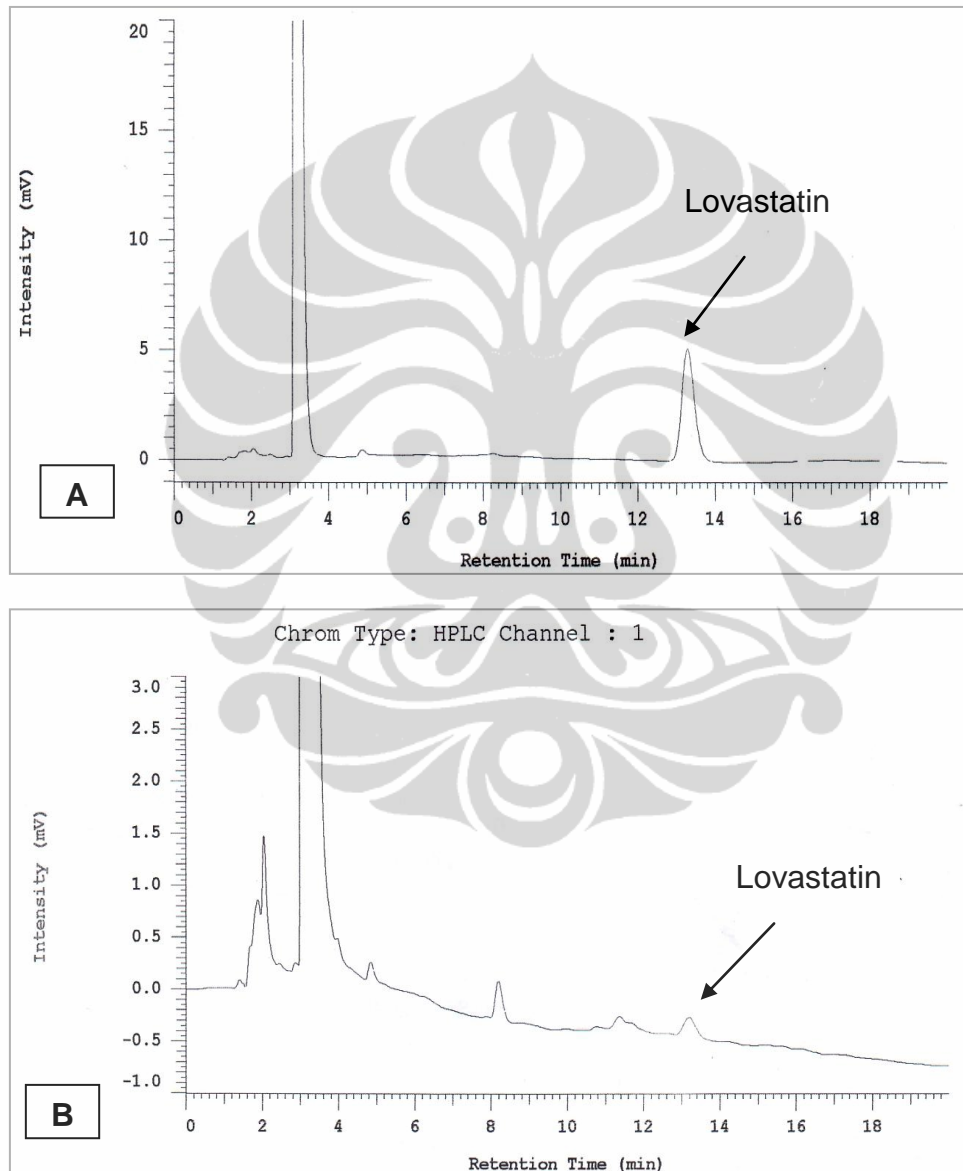
Analisis kuantitatif menghasilkan urutan nilai terbesar untuk kadar senyawa lovastatin pertama adalah *Asp. flavus* UICC 360 (85,8 mg/L), kedua adalah *Aspergillus* sp. UICC 317 (77,6 mg/L) dan ketiga adalah *Aspergillus* sp. Shi 3.2 (69,7 mg/L). Sedangkan dari data skrining dengan metode paper disk urutan zona bening yang terbesar pertama adalah *Aspergillus* sp. UICC 317 (5,18 mm), kedua adalah *Aspergillus* sp. Awy V.1 (4,89 mm) dan ketiga adalah *Asp. flavus* UICC 360 (4,87 mm), sedangkan *Aspergillus* sp. Shi 3.2 (3,50 mm). Analisis kualitatif dengan TLC yang memiliki nilai Rf sama dengan nilai Rf standart lovastatin adalah *Asp. flavus* UICC 360 (0,24), *Aspergillus* sp. UICC 317 memiliki nilai Rf lebih tinggi dari standart (0,27) sedangkan *Aspergillus* sp. Awy V.1 memiliki nilai Rf 0,26 dan *Aspergillus* sp. Shi 3.2 memiliki nilai Rf 0,23. Berdasarkan hasil skrining dengan metode paper disk, analisis kualitatif (nilai Rf), analisis kuantitatif dan perubahan pH maka *Asp. flavus* UICC 360 yang dipilih untuk penelitian lebih lanjut.

## **2.6 Analisis HPLC Lovastatin dari *Aspergillus flavus* UICC 360.**

Penentuan identifikasi lovastatin pada *Aspergillus* spp. yang memberikan hasil paling tinggi yaitu *Asp. flavus* UICC 360 dilakukan dengan HPLC, dengan menggunakan kolom C-18 (250 x 46 cm), pelarut asetonitril dan asam fosfat (60:40) (v/v), dengan kecepatan 1,5 mL/menit, deteksi dengan UV pada  $\lambda$ 235 nm, suhu kolom 30°C.

Analisis kromatogram HPLC menunjukkan adanya satu puncak dari standart lovastatin, dengan waktu retensi selama 13,2 menit (Gambar 1.7 A), sedangkan kromatogram ekstrak lovastatin isolat *Asp. flavus* UICC 360 juga menunjukkan adanya puncak pada waktu retensi yang sama dengan standart lovastatin selama 13,2 menit (Gambar 1.7 B). Hasil tersebut memastikan bahwa ekstraksi etil-asetat dari hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 adalah lovastatin. Waktu retensi adalah waktu yang diperlukan oleh suatu senyawa untuk larut secara maksimal dari partikel larutan yang ditunjukkan dengan munculnya puncak dalam kromatogram (Boyer, 1986).

Frederich *et al.* (1995) melakukan analisis mevinolin hasil fermentasi menggunakan kolom 250 x 4 mm, pada suhu 40°C, dapat terdeteksi pada  $\lambda$  237 nm, dengan menghasilkan hanya satu puncak dalam bentuk asam- $\beta$ -hidroksi. Lueje *et al.* (2005) melaporkan lovastatin dalam bentuk asam- $\beta$ -hidroksi dapat dideteksi dengan HPLC dengan kondisi kolom C-18, asetonitril-metanol-fosfat bufer pH 4 sebagai fase bergerak pada suhu 45°C, kecepatan 1,5 mL deteksi pada  $\lambda$  238 nm.



Gambar I. 7. Kromatogram *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) lovastatin pada *Asp. flavus* UICC 360.

Keterangan: A. Standart lovastatin  
B. Lovastatin *Asp. flavus* UICC 360



### 3. KESIMPULAN DAN SARAN

#### 3.1 KESIMPULAN

Hasil skrining lovastatin terhadap 40 biakan *Aspergillus* spp. koleksi UICC dengan metode paper disk dihasilkan sebanyak 18 (45%) biakan positif dan 22 (55%) biakan negatif. *Asp. flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin tertinggi dibandingkan sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih. Analisis *Thin Layer Chromatography* (TLC) menunjukkan nilai Rf sepuluh *Aspergillus* spp. adalah (0,23 – 0,27) dan standart (0,24). Analisis *High Performance Chromatography* (HPLC) menunjukkan lovastatin *Asp. flavus* UICC 360 mempunyai waktu retensi (13,2 menit) sama dengan standart (13,2 menit).

#### 3.2 SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai medium yang paling baik untuk produksi lovastatin secara maksimal.
2. Mengingat dalam hasil analisis HPLC ditemukannya puncak lain selain puncak lovastatin maka perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai adanya senyawa lain dalam ekstrak selain senyawa lovastatin.

## DAFTAR ACUAN

- Alberts, A.W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff & C. Hoffman. 1980. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **77** (7): 3957-3961.
- Atalla, M.M., A.F. Shahaby, E.R. Hamed & M.K. Zahra. 1999. Optimization of fermentation conditions for production of hypocholesterolaemic agent mevinolin by *Penicillium patulum*. *Egyptian Journal of Applied Science* **14** (3): 102-114.
- Atalla, M.M., E.R. Hamed & A.R. El-Shami. 2008. Optimization of a culture medium for increased mevinolin production by *Asp. terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology*, **4** (2): 6- 10.
- Aryantha, I.N.P., S. Widayanti & Yuanita. 2004. Eksplorasi fungi deuteromycetes (*Asp. sp. dan Penicillium sp.* ) penghasil senyawa anti kolesterol lovastatin. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Teknologi Bandung. 32 hlm.
- Awad, G., F. Mathieu, Y. Coppel & A. Lebrihi. 2005. Characterization and regulation of new secondary metabolite from *Asp. ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 59-67.
- Boyer, R. F. 1986. *Modern experimental biochemistry*. Edison Wesley Publishing Company, Inc. Canada: xv + 584 hlm.
- Cheung, A. K., G.A. DeVault & M.C. Gregory. 1993. A prospective study on treatment of hypercholesterolemia with lovastatin in renal transplant patients receiving cyclosporine. *Journal of The American Society of Nephrology* **3** (12): 1884-1891.

- Cimerman, N.G., J. Friedrich, A. Cimerman & N. Benicki. 2006.  
Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase:  
Production of mevinolin by fungi of the genus *Pleurotus*. *The Federation of European Materials Societies Microbiology Letters* **11** (2-3): 203-206.
- Crueger, W. & A. Crueger. 1984. *Biotechnology: A Text-book of industrial microbiology*. Science Technology, Inc. Madison: x + 308.
- Endo, A. 2008. A gift from nature: the birth of the statins, *Nature medicine* **14** (10): 1-3.
- Ferron, M.A.V., J.L.C. Lo'pez, J.A.S. Pe'rez, J.M.F. Sevilla & Y. Chisti. 2005. Rapid screening of *Asp. terreus* mutants for overproduction of lovastatin. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **21**: 123–125.
- Friedrich, J.I., M.Z. Ek, B.M. Ina, A. Cimerman, A. Strancar & I. Rade. 1995. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. *Journal of Chromatography*. **704** (2): 363-367.
- Gandjar, I., I.R. Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya. 1992. *Pedoman praktikum Mikrobiologi Dasar*. Jurusan Biologi, FMIPA, UI, Jakarta: vii + 87 hlm.
- Gandjar, I., R.A. Samson, K. Van den Tweel-Vermeulen, A. Oetari & I. Santoso. 1999. *Pengenalan kapang troptik umum*. Yayasan Obor Indonesia: viii + 138 hlm.
- Gandjar, I., W. Sjamsuridzal & A. Oetari. 2006. *Mikologi Dasar dan Terapan*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta: xi + 238 hlm.
- Ganiswara, S.G. S. Rianto, D.S. Frans & Purwastyastuti. 1985. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V. Jakarta. Bagian Farmakologi Kedokteran UI: x + 643 hlm.
- Greval, H.S. & K.L. Kalra (1995). Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances* **13**: 209–234.
- Griffin, D.H. 1984. *Fungal physiology*. John Wiley & Sons, Toronto: xii + 383 hlm.

- Hajjaj, H., P. Niederberger & P. Duboc. 2001. Lovastatin biosynthesis by *Asp. terreus* in a chemically defined medium. *Applied and Environmental Microbiology*. **67** (6): 2596-602.
- Hendrickson, L., C.R. Davis, C. Roach, D.K. Nguyen, T. Aldrich, P.C. Mc Ada & C.D. Reeves. 1999. Lovastatin biosynthesis in *Asp. terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Journal of Chemistry and Biology*. **6** (7): 429-439.
- Kaur, H., A. Kaur, H. S. Saini, & B. S. Chadha. 2009. Screening and selection of lovastatin hyper-producing mutants of *Asp. terreus* using cyclic mutagenesis. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. **56** (2): 169-180.
- Kawai, Y., M. Otaka, & M. Kaiko. 1994. Screening of antioxidant producing Fungi in *Asp. niger* Group for liquid and Solid State Fermentation. *Bull. Fac. Fish Hokkaido*. **45** (1): 26-31.
- Kennedy, J., K. Auclair, S.G. Kendrew, C. Park & J.C. Vederas. 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*. **284** (5418): 1368-1372.
- Klich, M.A. 2002. *Identification of common Asp. species*. *Centraalbureau Voor Schimmelcultures*. Utrecht. The Netherlands: i + 116 hlm.
- Kumar, M.S., P.M. Kumar, H.M. Sarnaik & A.K. Sadhukhan. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Asp. terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay. *Journal of Microbiological Methods* **40**: 99-104.
- Lai L.S.T., Pan C.C., & B.K. Tzeng. 2005. The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Asp. terreus* in submerged cultures. *Process Biochemistry* **38** (9): 1317-1326.

- Lee, J.W., S.M. Lee, K.S. Gwak, J.Y. Lee & I.G. Choi. 2006. Screening of edible mushrooms for the production of lovastatin and its HMG-CoA reductase inhibitory activity. *The Korean Journal of Microbiology*. **42** (2): 83-88.
- Lopez, J., J. Scanchez, J. Fernandez, F. Fernandez, E. Grima & Y. Chisti. 2003. Production of lovastatin by *Asp. terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme and Microbial Technology* **33**: 270-277.
- Lueje, A., A.P. Sepulveda. J. Squella, J.A. Nunez & J.V. Luis. 2005. Lovastatin HPLC hydrolysis performance liquid-chromatography Tandem Mass spectrometry. *Journal of Chilean Chemical Society* **50** (4): 639-646.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko & J. Parker. 2000. *Brock biology of microorganism*. 9<sup>th</sup> ed. Prentice Hall International Inc. New Jersey: xvii + 986.
- Miyake T, K. Uchitomi, M.Y. Zhang, I. Kono, N. Nozaki, H. Sammoto & K. Inagaki . 2006. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilosus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70** (5): 1154-1159.
- Moore- Landecker, E. 1972. *Foundamentals of the fungi*. Pretince-Hall, Inc. Englewood Cliffs: xiii + 482 hlm.
- Mo H., X. Xu , M. Yan & Y. Ziu. 2005. Microbiological analysis and antibacterial effects of the indigenous fermented Puer tea. *Agrofood Industry Hi-Tech* **16**: 16–18.
- Nauli, T. & L.Z. Udin. 2006. Model Fermentasi Lovastatin. *Akta Kimindo* **1** (2): 99-104.
- Rahman 1992. *Teknologi fermentasi*. Penerbit Arcan. Jakarta: viii + 188
- Raper, K.B. & D.L. Fennel, 1965. *The Genus Asp.*.The Williams & Wilkins Company. Baltimore: ix + 686 hlm.
- Samiee, S.M., N. Moazami & S. Haghghi. 2003. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal* **7** (1): 29-33.

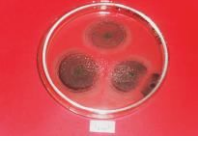
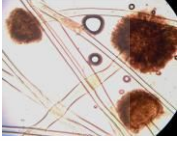


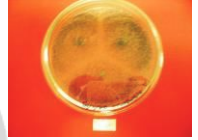

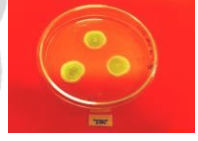
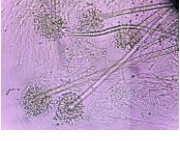

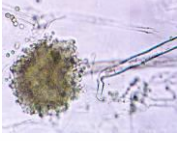


- Samson, R.A., E.S. Hoekstra & C.A.N. Van Oorschot. 1984. *Introduction to food Borne Fungi*. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Baarn. Delf. 1-234.
- Sayyad, S.A, B. P. Panda, S. Javed & M. Ali. 2007. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **73** (5): 1054–1058.
- Shinida A. A. 2001. Some nutritional factors influencing mevinolin production by *Asp. terreus* strain. *Folia Microbiology* (Praha). **46** (5):413-416.
- Szakacs, G., G. Morovjan, R. P. Tengerdy. 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Asp. terreus*. *Biotechnology Letters* **20** (4): 411–415.
- Papagianni, M. 2007. Advances in citric acid fermentation by *Asp. niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances* **25** (3): 244-263.
- Tamamura, T., K. Wada, K. Takara, N. Ishikawa, K. Iwbuchi, Y. Nakasone, I. Chinen. 2001. Analysis of volatile compounds in Awamori using solid state phase extraction. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology– Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* **48**: 202–209.
- Tobert, J.A. 2003. Lovastatin and beyond: The history of the HMG CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* **2**: 517-526.

Lampiran 1.1. Hasil Pengamatan makroskopis dan mikroskopis *Aspergillus* spp. koleksi University of Indonesia Culture Collection

	Mikroorganisme	Hasil Pengamatan	Gambar	
			Makroskopis	Mikroskopis
1.	<i>Asp. ochraceus</i> UICC 95	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kuning-kecoklatan terdiri dari lapisan konidiofor yang tebal. Mikroskopis vesikel bulat, berwarna hialine, biseriata, konidia globose-semi bulat, berdidinding kasar sampai halus.		
2.	<i>Asp. niger</i> UICC 75	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriata, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
3.	<i>Asp. cervinus</i> UICC127	Pengamatan makroskopis koloni berwarna putih pada tepi dan kuning kecoklatan di tengah. Mikroskopis kepala koniadia radiate, kuning terang, vesikel globose, unisariata, konidia spherical halus.		
4.	<i>Asp. clavatus</i> UICC132	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau kebiru2an, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel seperti gada, biseriata, konidia ellips, berwarna hijau, halus.		
5.	<i>Asp. carbonarius</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau kuning kecoklatan, kepala konidia radiate, Mikroskopis vesikel sperikal, biseriata, konidia bulat, berwarna coklat kehitaman, adanya ornamen yang kasar.		

6.	<i>Asp. ficuum</i> (46)	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam-agak kecoklatan kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, agak kasar.		
7.	<i>Asp. fumigatus</i> UICC 107	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau tua, kepala konidia berbentuk kolumnar, Mikroskopis vesikel seperti gada melebar, uniseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna hijau, dengan dinding kasar.		
8.	<i>Asp. phoenicus</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
9.	<i>Asp. niger</i> UICC 77	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
10.	<i>Asp. tubingensis uli</i> UICC 27	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam-agak kecoklatan kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, agak kasar.		
11.	<i>Asp. awamori</i> UICC 31	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia radial, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia spherical, berwarna hitam, halus.		



12.	<i>Asp. ficuum</i> UICC 41	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam-agak kecoklatan kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, agak kasar.		
13.	<i>Asp. terreus</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna coklat kekuningan, kepala konidia coklat kekuningan kolumnar, Mikroskopis vesikel simibulat, biseriate, konidia bulat-ellips, berwarna kuning muda-hialin, berdinding halus.		
14.	<i>Asp. niger</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen.		
15.	<i>Asp. nidulans</i> UICC 352	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kuning-kehijauan, kepala konidia kolumnar. Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, berwarna kekuningan, kasar.		
16.	<i>Aspergillus sp. Shi 10.b</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kuning-kehijauan, kepala konidia kolumnar. Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, berwarna kekuningan, kasar.		
17.	<i>Aspergillus sp. Shi 18.1</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau gelap hampir hitam, kepala konidia radiate. Mikroskopis vesikel subglobose, unisariate, konidia bulat, berwarna kehijauan.		

18.	<i>Aspergillus sp. BC</i> I.1	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau tua, kepala konidia berbentuk kolumnar, Mikroskopis vesikel seperti gada melebar, uniseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna hijau, dengan dinding kasar.		
19.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 12.2	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kehijauan, kepala konidia kolumnar. Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat, berwarna kekuningan, kasar.		
20.	<i>Asp. flavus</i> UICC 356	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuning-2an , kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
21.	<i>Aspergillus sp. Awy</i> V.1	Pengamatan makroskopis koloni berwarna coklat kekuningan, kepala konidia coklat kekuningan kolumnar, Mikroskopis vesikel simibulat, biseriate, konidia bulat-ellips, berwarna kuning muda-hialin, berdinding halus.		
22.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 10.A	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau, kepala konidia berbentuk radiate, Mikroskopis vesikula seperti semibulat, uniseriate, konidia bulat, berwarna kuning-hijau, dengan dinding kasar.		
23.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 8.3	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau tua, kepala konidia berbentuk kolumnar, Mikroskopis vesikula seperti gada melebar, uniseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna hijau, dengan dinding kasar.		

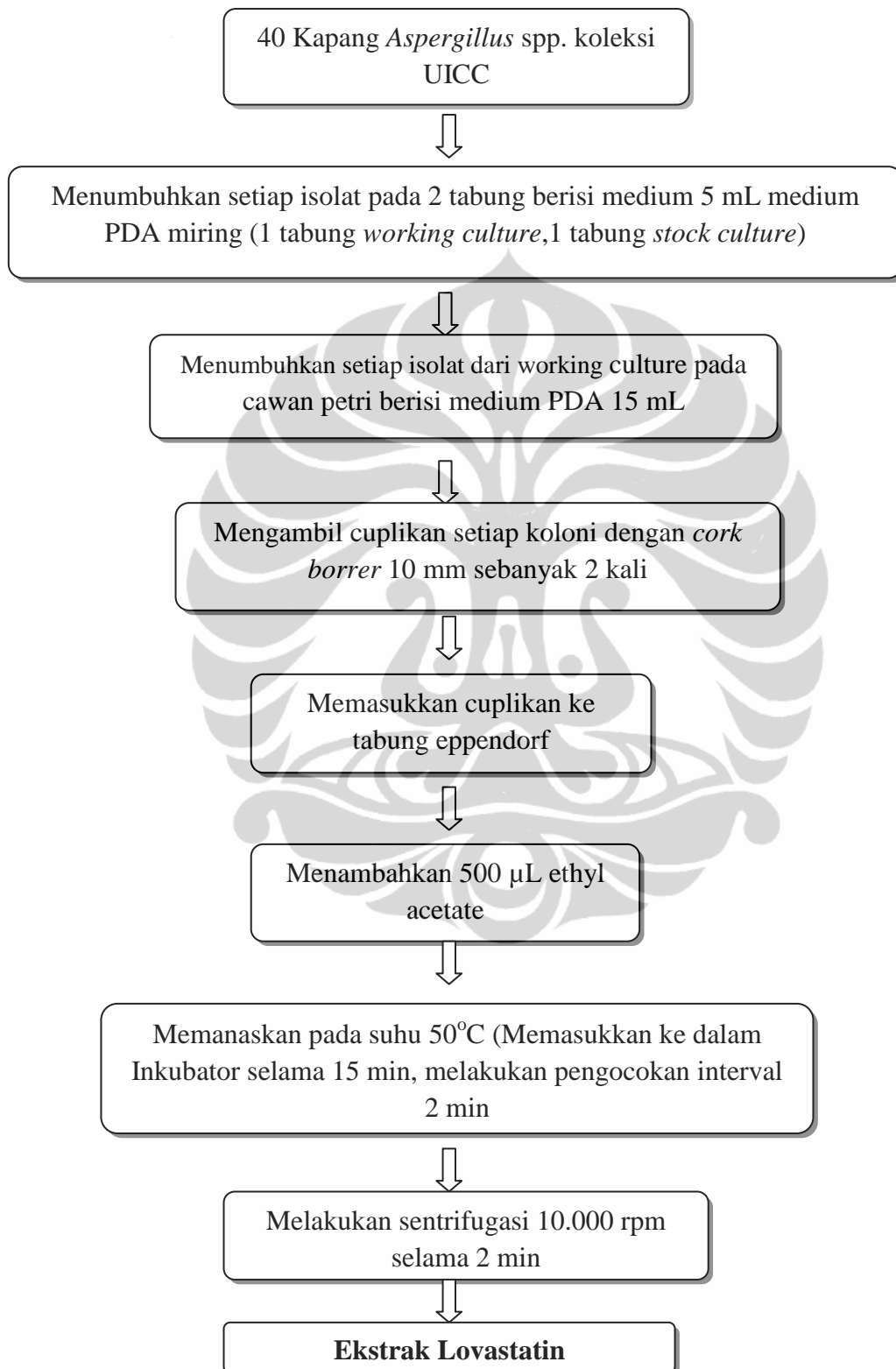
24.	<i>Aspergillus sp.</i> <b>UICC 317</b>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna coklat kekuningan, kepala konidia coklat kekuningan kolumnar, Mikroskopis vesikel simibulat, biseriate, konidia bulat-ellips, berwarna kuning muda-hialin, berdinding halus.		
25.	<i>Aspergillus sp.</i> Shi <b>20.1</b>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau, kepala konidia berbentuk radiate, Mikroskopis vesikula seperti semibulat, uniseriate, konidia bulat, berwarna kuning-hijau, dengan dinding kasar.		
26.	<i>Aspergillus sp.</i> Shi <b>16.1</b>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna biru kehijauan, kepala konidia berbentuk radiate, Mikroskopis vesikula seperti bulat, biseriate, konidia bulat, berwarna kuning-hijau.		
27.	<i>Aspergillus Air V.4</i>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau, kepala konidia berbentuk radiate, Mikroskopis vesikula seperti semibulat, uniseriate, konidia bulat, berwarna kuning-hijau, dengan dinding kasar.		
28.	<i>Asp. flavus</i> UICC <b>359</b>	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuningan, kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
29.	<i>Asp. niger</i> 371	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia hitam, bulat, Mikroskopis vesikula bulat, biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat, adanya ornamen		

30.	<i>Asp. awamori</i> (9)	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hitam, kepala konidia radiate, Mikroskopis vesikula globose, biseriate, konidia spgerical, berwarna coklat kehitaman.		
31.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 2.2	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuningan , kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
32.	<i>Asp. flavus</i> UICC 360	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuningan , kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
33.	<i>Asp. flavus</i> UICC 361	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuningan , kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
34.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 12.3	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau gelap dengan pinggir dan tengah berwarna putih kekuningan, kepala konodia radiate hampir columnar, berwarna coklat kuning. Vesikula globose ke sub globose, uniseriate.		
35.	<i>Asp. terreus</i> UICC 370	Pengamatan makroskopis koloni berwarna coklat-kekuningan, kepala konidia berbentuk kolumnar, berwarna coklat-kekuningan Mikroskopis vesikula semibulat, biseriate, konidia bulat, kuning-muda, dinding halus.		

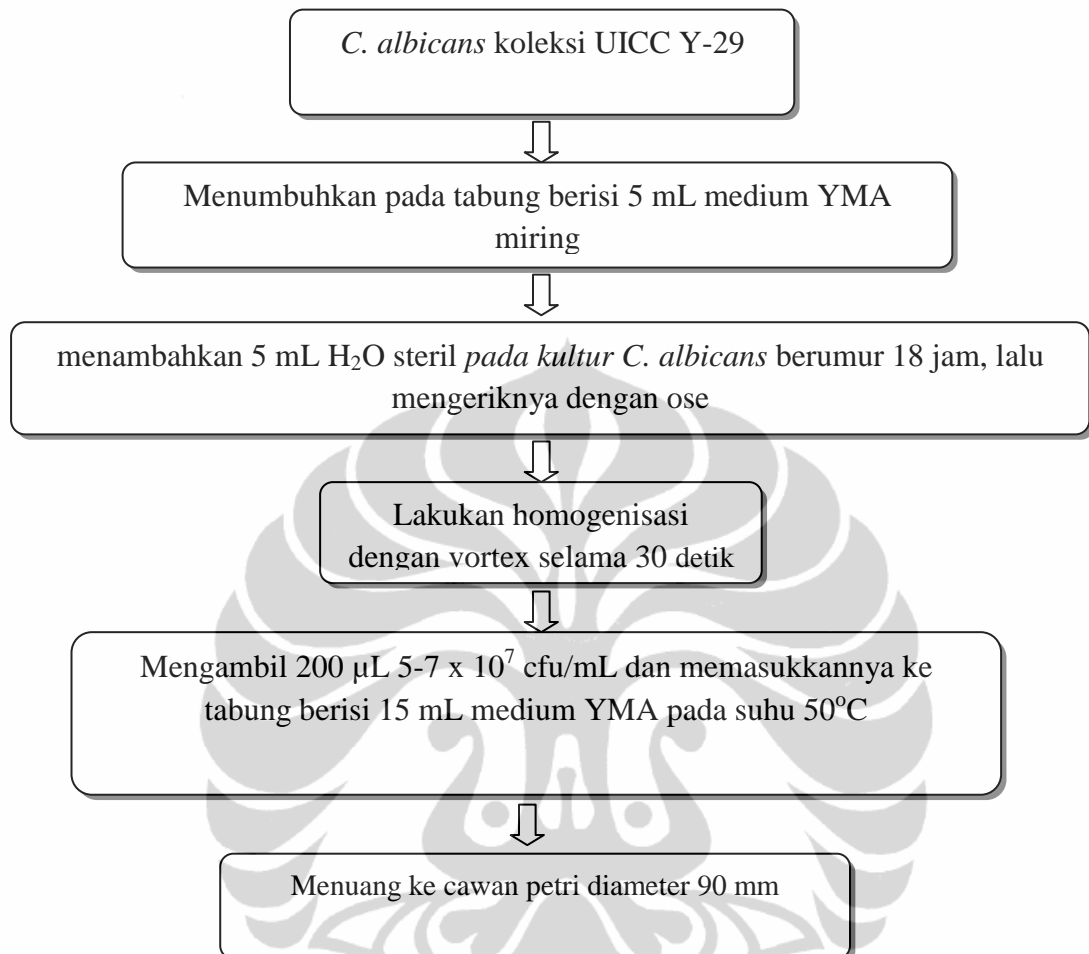


36.	<i>Asp. fumigatus</i> UICC 358	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau tua, kepala konidia berbentuk kolumnar, Mikroskopis vesikula seperti gada melebar, uniseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna hijau, dengan dinding kasar.		
37.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 4.2	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kuning-coklat, konidiofora kasar, Mikroskopis vesikula bulat-semibulat., biseriate, konidia bulat-semi bulat, berwarna coklat-kekuningan, dengan ornamen yang jelas, seperti kutil.		
38.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 3.2	Pengamatan makroskopis koloni berwarna kehijauan, kepala konidia radiate. Mikroskopis vesikula semibulat., uniseriate, konidia bulat, berwarna kuningkehijauan, dengan permukaan kasar.		
39.	<i>Asp. flavus</i> UICC 362	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau-kekuningan, kepala konidia berbentuk bulat, Mikroskopis vesikula seperti bulat-semibulat, uniseriate, konidia bulat-semibulat, berwarna hijau-pucat, dengan duri.		
40.	<i>Aspergillus sp. Shi</i> 21.1	Pengamatan makroskopis koloni berwarna hijau gelap, kepala konidia radiate hampir kolumnar. Mikroskopis vesikel bulat, biseriate, konidia bulat agak kasar, berwarna kekuningan.		

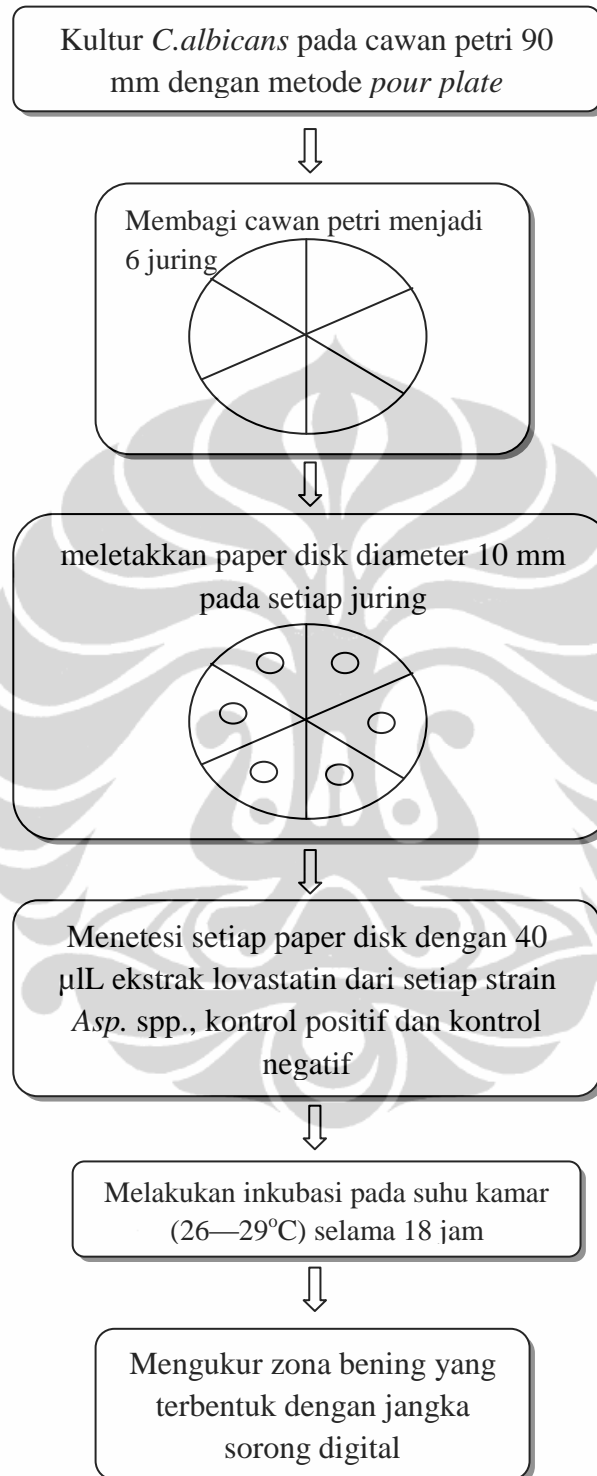
Lampiran 1.2 Alur Kerja Persiapan Kapang *Aspergillus* spp. (Ferron *et.al.* 2005).



Lampiran 1.3 Alur kerja persiapan bioassay *C. albicans* UICC Y-29

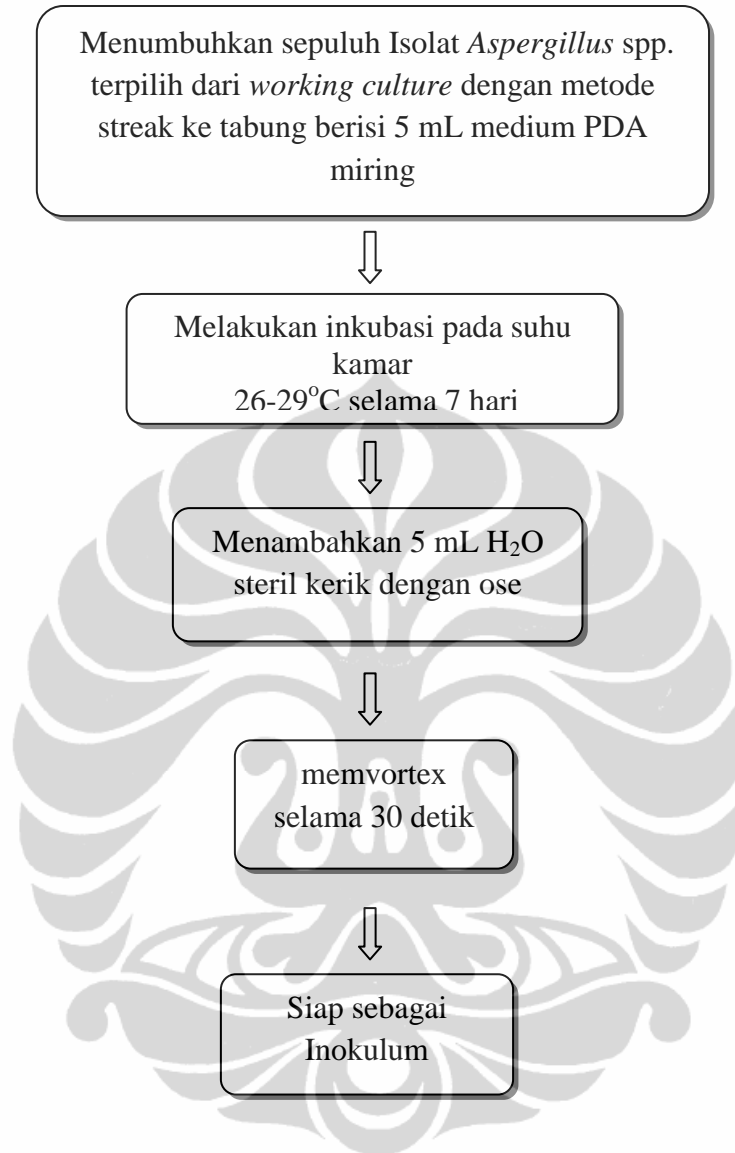


Lampiran 1.4 Alur kerja skrining assay lovastatin

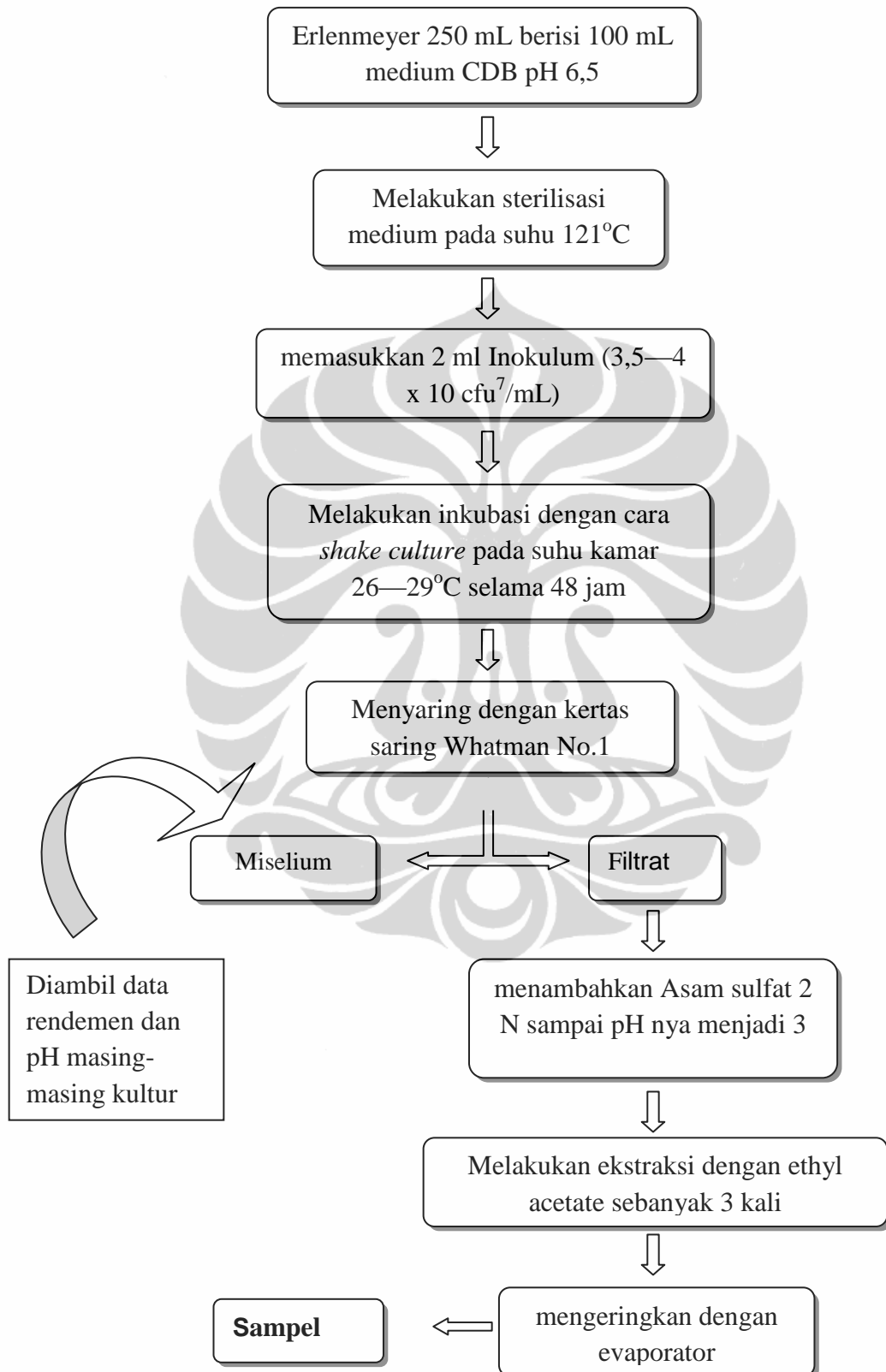




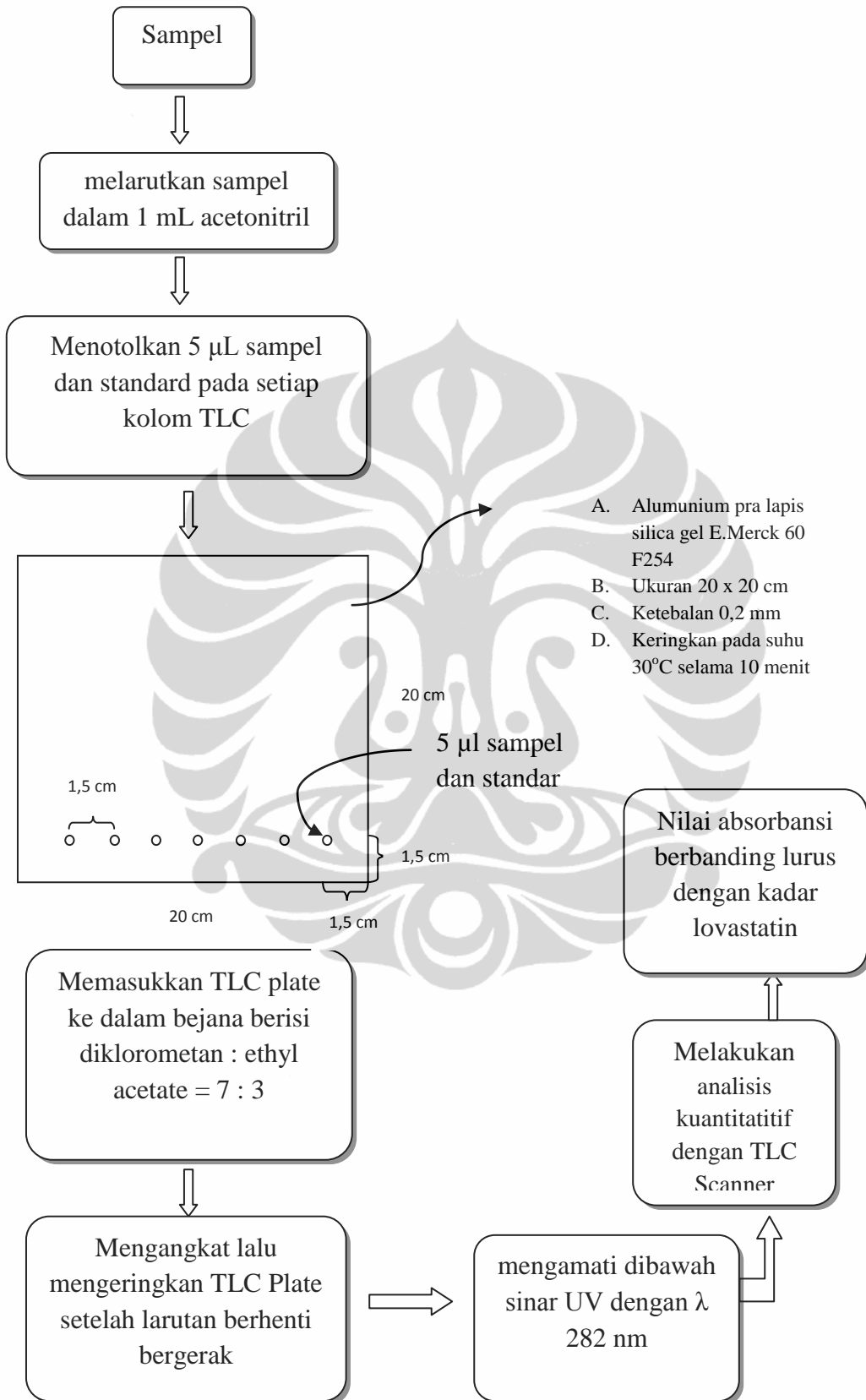
Lampiran 1.5 Alur kerja persiapan inokulum *Aspergillus* spp. terpilih



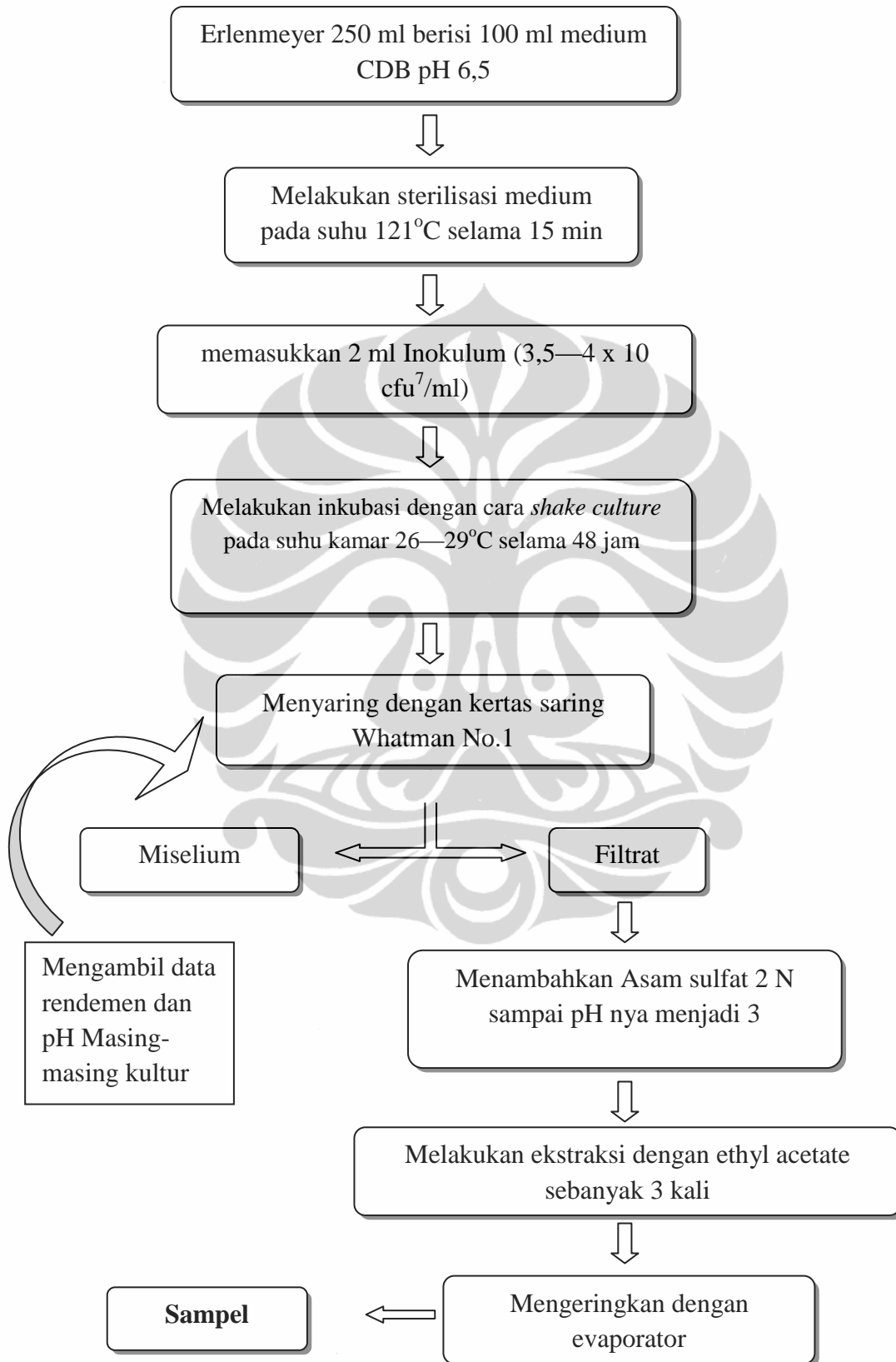
Lampiran 1.6 Alur kerja fermentasi produksi Lovastatin (modifikasi Atalla *et.al.*2008)



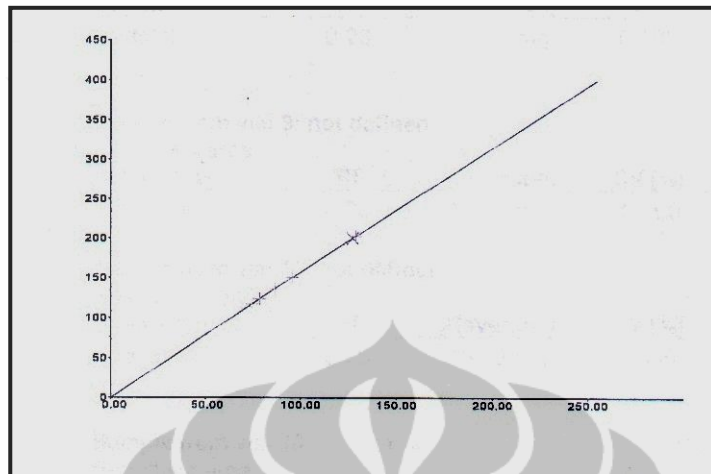
Lampiran 1.7 Alur kerja analisis kadar lovastatin dengan TLC.



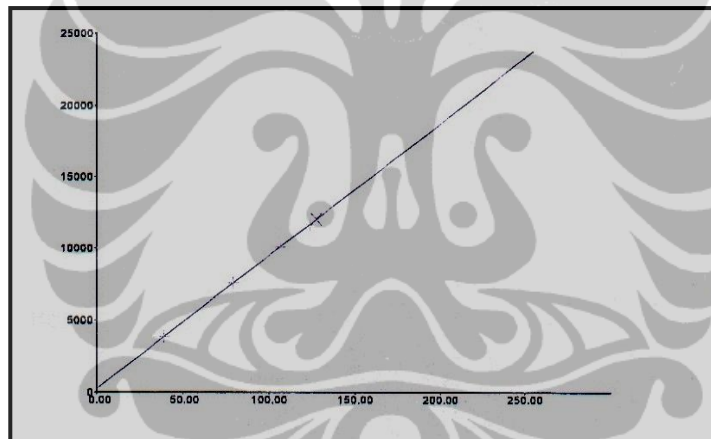
Lampiran 1.8 Alur kerja produksi Lovastatin untuk uji kolesterol



Lampiran 1.9 Kurva kalibrasi standart lovastatin berdasarkan tinggi puncak



Lampiran 1.10 Kurva kalibrasi standart lovastatin berdasarkan luas area



Lampiran 1.11 Rumus perhitungan kadar lovastatin pada sampel

$$\text{Kadar lovastatin pada sampel} = \frac{\frac{\text{Luas area sampel}}{\text{Luas area standart}} \times \text{Volume sampel (L)} \times \text{Faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

## ABSTRAK

Nama : YANTI RAFLIYANTI  
Program Studi : BIOLOGI  
Judul : PENGARUH EKSTRAK LOVASTATIN KAPANG  
*Aspergillus* spp. TERHADAP KADAR KOLESTEROL  
DALAM DARAH TIKUS PUTIH (*Rattus norvegicus* L.)  
GALUR Sprague Dawley.

Lovastatin adalah inhibitor kompetitif yang potensial dalam aktivitas 3-*hidroksi-3-metilglutaril-CoA* (HMG-CoA) reduktase yang berperan dalam biosintesis kolesterol. Penelitian dilakukan dengan pemberian ekstrak lovastatin yang dihasilkan dari fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 dengan tiga macam dosis yang berbeda (0,1, 0,2 dan 0,4 mg/hari) pada tikus putih dan menganalisis pengaruhnya terhadap kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus, percobaan dilakukan selama 14 hari. Hasil penelitian menunjukkan lovastatin pada dosis 0,1 % mg/hari menurunkan kadar total kolesterol, trigliserida dan kolesterol LDL serta meningkatkan kolesterol HDL secara statistik tidak nyata, pada dosis 0,2 mg/hari menurunkan trigliserida sampai (61,76%) dengan beda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan kontrol negatif (21,28%), lovastatin pada dosis 0,4 mg/hari dapat menurunkan kadar kolesterol LDL (90%) dengan beda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dibandingkan dengan kontrol negatif (59,74%).

**Kata Kunci:** kolesterol HDL, kolesterol LDL, analisis, biosintesis, kolesterol total, trigliserida.

## ABSTRACT

Lovastatin is a competitive potential inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase activity, which plays a role in cholesterol biosynthesis. In this study, rats were given extract lovastatin produced from the fermentation of *Asp. flavus* UICC 360 with various of doses (0.1, 0.2 and 0.4 mg/day) on the rats and examined the effect on serum total cholesterol, triglyceride, HDL cholesterol and LDL cholesterol in the blood of rats for 14 days treatment. The lovastatin dose was given at 0,1 mg/day not only decreased the total cholesterol, triglyceride and LDL cholesterol, but also increased HDL cholesterol eventhough was not significant, and the dose lovastatin given at 0.2 mg/day caused lowering the triglyceride (61.76%) at level ( $p < 0.01$ ) compared with negative control (21.28%), also the dose lovastatin given of 0.4 mg/day was able to decrease LDL cholesterol levels (90%) at level ( $p < 0,01$ ) compared to the negative control (59.74%).

**Keywords:** HDL cholesterol, LDL cholesterol, analysis, biosynthesis, cholesterol total, tryglyceride.

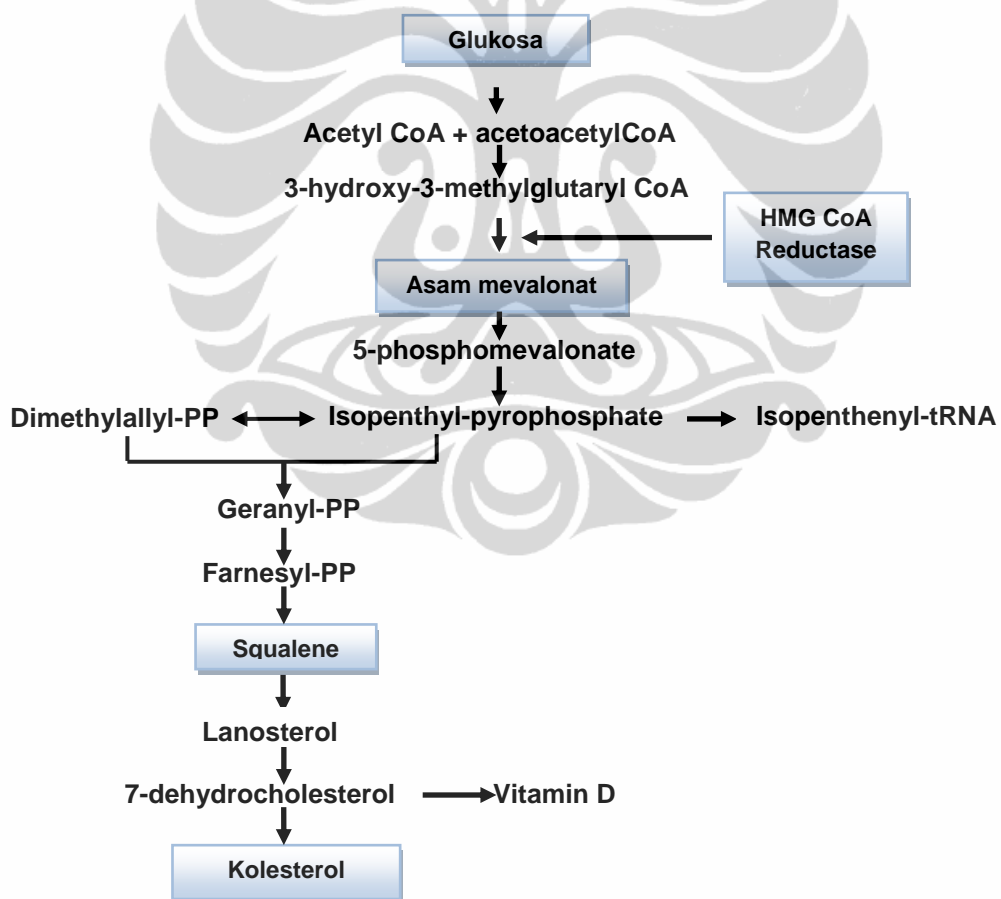
## 1. PENDAHULUAN

Kolesterol adalah salah satu senyawa penyusun lipid selain trigliserida, fosfolipid, cholesteryl ester, dan asam lemak bebas (Brody 1999). Kolesterol disintesis dalam organ hati, usus, korteks adrenal, dan jaringan reproduksi termasuk indung telur, testis, dan plasenta.

Menurut King (2009) sintesis kolesterol diawali dengan pengangkutan asetil-KoA dari mitokondria ke sitosol. Dalam sitosol melalui serangkaian reaksi, asetil-KoA dikonversi menjadi mevalonat. Proses tersebut diawali dengan dua molekul asetil-KoA, membentuk asetoasetil-KoA. Aktivitas *3-hidroksi-3-methylglutaril-CoA* (HMG-KoA) sintase mengubah asetoasetil-KoA dan molekul ketiga asetil-KoA menjadi HMG-KoA. HMG-KoA dikonversi menjadi mevalonat oleh enzim HMG-KoA reduktase, terikat pada retikulum endoplasma. Konversi HMG-KoA menjadi mevalonat oleh HMG-KoA reduktase membutuhkan dua molekul NADPH sebagai kofaktor. Mevalonat kemudian diaktifkan oleh tiga fosforilasi, menghasilkan 5 pyrophospho mevalonat. Setelah fosforilasi, dibebaskan satu molekul ATP sebagai hasil dekarboksilasi *isopentenyl pyrophosphate* (IPP), ATP mengaktifkan sebuah molekul isoprenoid sehingga menghasilkan squalene. Squalene mengalami dua langkah *cyclisasi* untuk menghasilkan lanosterol. Melalui serangkaian reaksi lanosterol dikonversi menjadi kolesterol (Gambar 2.1).

Kolesterol memiliki beberapa peranan penting antara lain, sebagai komponen penyusun membran sel, sebagai prekursor sintesis asam empedu dan sebagai prekursor dalam sintesis berbagai hormon steroid termasuk aldosteron, testosteron dan estrogen, dan (Krieger 1998; Daniels *et al.* 2009). Kolesterol yang beredar dalam plasma darah berasal dari dua sumber yaitu hasil sintesis dalam organ hati dan usus serta dari makanan atau diet. Ketika jumlah kolesterol dari diet berkurang maka untuk memenuhi kebutuhan sintesis beberapa senyawa penting, sintesis kolesterol dalam organ hati dan usus meningkat. Kolesterol yang disintesis dalam organ hati sebagian besar dikonversi menjadi asam empedu, sebagian disekresi ke dalam plasma darah dalam bentuk lipoprotein, selebihnya digunakan untuk memperkuat struktur membran plasma.

Pengaturan keseimbangan kadar kolesterol dalam darah berpusat pada metabolisme lipoprotein. Lipoprotein adalah ikatan antara lipid dengan protein tertentu. Setiap lipoprotein mengandung lipid dengan proporsi yang berbeda. Lipoprotein disintesis dalam usus dan hati kemudian disekresi ke dalam plasma darah dan berfungsi dalam transportasi berbagai lipid. Lipoprotein yang disintesis dalam usus membawa lipid diserap dari makanan, lipoprotein tersebut disebut kilomikron. Kilomikron meninggalkan usus dan memasuki aliran darah melalui sistem limfatik. Lipoprotein yang diproduksi di dalam hati membawa lipid yang berasal dari sintesis dalam organ hati disebut *very low density lipoprotein* (VLDL), dikeluarkan dari hati ke dalam aliran darah. Hati juga mensintesis dan mengeluarkan lipoprotein lain disebut *high density lipoprotein* (HDL)



Gambar 2.1 Biosintesis kolesterol (Sumber: [www.scienceforlife.eu](http://www.scienceforlife.eu))



Kilomikron berisi sebagian kecil protein, sedangkan HDL memiliki kandungan protein relatif tinggi. Hal penting yang menentukan sifat spesifik dari setiap lipoprotein adalah identitas dan fungsi dari proteinnya (Daniels *et al.* 2009).

Dalam laboratorium klinis kadar kolesterol total dapat diperkirakan melalui reaksi Lieberman-Burchard. Proporsi kolesterol bebas esterifikasi dapat ditentukan dengan kromatografi gas cair. Kadar kolesterol total dalam plasma darah orang sehat normalnya adalah 150 – 200 mg/dL. Ketika kadar kolesterol total dalam plasma darah di atas ambang batas normal menyebabkan suatu keadaan disebut hiperkolesterolemia. Menurut Krieger (1998) hiperkolesterolemia merupakan faktor risiko untuk penyakit kardiovaskuler seperti atherosklerosis. Schaefer *et al.* (1995) melaporkan beberapa faktor lain, seperti gaya hidup, usia, dan hipertensi dapat juga menyebabkan penyakit kardiovaskuler. Atherosklerosis dapat menyebabkan aliran darah ke jantung maupun ke otak tersumbat, sehingga memungkinkan terjadinya stroke atau serangan jantung (Manzonni *et al.* 2002).

Lovastatin merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan dari proses fermentasi berbagai jenis kapang. Penelitian terhadap berbagai jenis kapang dalam kelas Basidiomisetes dan Deuteromisetes mampu memproduksi lovastatin misalnya, *Monascus ruber*, *Penicillium brevicompactum*, dan *Asp. terreus* (Alberts *et al.* 1980; Hassan *et al.* 2001; Samiee *et al.* 2003). Atalla *et al.* (2008) melaporkan bahwa *Asp. terreus* J9 mampu menghasilkan lovastatin. Miyake *et al.* (2006) meneliti produksi lovastatin pada *Monascus pilosus*.

Hasil penelitian yang disajikan dalam makalah pertama dalam penelitian menunjukkan bahwa *Asp. flavus* UICC 360 mampu menghasilkan lovastatin ditumbuhkan pada medium *Czapek Dox Broth* (CDB), juga telah dilakukan analisis TLC dan HPLC untuk mengkonfirmasi bahwa hasil fermentasi dari kapang tersebut berupa lovastatin. Pengujian lebih lanjut akan dilakukan untuk mengetahui apakah lovastatin dari kapang tersebut dapat menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL dan meningkatkan kolesterol HDL dalam darah tikus galur Sprague Dawley.

Penelitian tentang penurunan kolesterol total oleh lovastatin yang dihasilkan oleh kapang telah dilaporkan oleh Kasim *et al.* (2005), proses fermentasi beras (angkak) dengan kapang *Monascus purpureus* menghasilkan lovastatin, pengujian terhadap tikus galur *Spague Dawley* dapat menurunkan kadar kolesterol sampai 20,78 % dengan pemberian selama 24 hari sebanyak 20 g/hari/tikus. Zulfiana (2003), melaporkan pemberian ekstrak statin dari *Monascus purpureus* Went TISTR 3090 yang diekstrak dari tepung tempe mampu menurunkan kolesterol total sampai 39,55% setelah diberikan selama 3 hari pada dosis 10 mg/kg berat badan. Windayanthi (2007) menggunakan biomassa kering dan ekstrak tempe yang mengandung ergosterol dihasilkan dari *Rhizopus* spp. dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida selama perlakuan 3 hari pada tikus putih *Rattus norvegicus* strain *Wistar*.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh lovastatin yang dihasilkan oleh *Asp. flavus* UICC 360 dalam menurunkan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL dan meningkatkan kadar kolesterol HDL dalam darah tikus.

## **1.1 LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN**

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Perkembangan Hewan dan Tumbuhan, Departemen Biologi, FMIPA, Universitas Indonesia, Depok, dan di Laboratorium Klinik Bahar Medika, Depok, mulai bulan Maret – Mei 2010.

## **1.2 ALAT, BAHAN DAN CARA KERJA**

### **1.2.1 ALAT**

Peralatan yang digunakan antara lain: sonde lambung, tabung *ependorf*, pipet kapiler *hematokrit*, neraca analitik (Ohaus), *sentrifuge*, gelas ukur, labu *Erlenmeyer*, kompor listrik, kandang tikus.

#### **1.2.1.1 Hewan percobaan**

Hewan yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus* L.) galur Sprague Dawley, jantan, berumur 2 bulan dengan berat  $\pm$  200 g sebanyak 25 ekor. Tikus diperoleh dari Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan (POM) Departemen Kesehatan, Jakarta.

## **1.2.2 BAHAN**

### **1.2.2.1 Bahan Uji**

Bahan uji adalah ekstrak lovastatin hasil fermentasi kapang *Asp. flavus* UICC 360 yang merupakan hasil makalah I ( Gambar II. 2 ). Sebagai pembanding adalah lovastatin murni (99%) (Sigma). Minyak kelapa (curah) untuk meningkatkan kadar kolesterol tikus, *Carboxy Methyl Cellulose* (CMC) (Merck) sebagai pengemulsi ekstrak lovastatin. Pelet atau pakan tikus (CV. Kasman Sunter). Komposisi nutrisi dalam pakan tercantum pada Lampiran 2.1.

### **1.2.2.2. Bahan Kimia**

Reagen Kit Kolesterol komplet Test enzimatis-kolorimetri metode CHOD-POD Code HB006, 2 x 125 mL (Cypress Diagnostics 2008), Reagen Kit Trigliserida komplet GPO enzimatis Cat. No 063-0249A 3 x 50 mL (ST. Reagensia), Reagen Kit kolesterol HDL Kolesterol komplet (Phosphotungstic precipitation Code HB007, 3 x 10 mL) (Cypress Diagnostics 2008) dan eter teknis.

## **1.2.3 CARA KERJA**

### **1.2.3.1 Persiapan Hewan Uji**

Sebanyak 25 ekor tikus percobaan diadaptasikan di dalam kandang selama 14 hari untuk menyesuaikan diri dengan lingkungan yang baru. Tikus diberi makan pelet dan minum secara *ad libitum* (tanpa batas), pelet diberikan dalam wadah dan diletakkan di dalam kandang sedangkan minum diberikan dalam botol yang diselipkan melalui kawat penutup. Kandang diberi alas serutan kayu untuk menyerap kotoran, alas serutan kayu diganti setiap hari. Kandang dibersihkan setiap hari dengan cara direndam dalam disinfektan selama 5 menit selanjutnya dicuci dengan sabun dan terakhir dibilas dengan air sampai bersih. Kandang-kandang yang berisi tikus diletakkan pada rak-rak dalam ruangan berukuran 6 x 8 meter. Ruangan diterangi dengan lampu fluoresensi 36 watt selama 12 jam setiap hari dengan suhu ruang 28--30°C dan kelembaban relatif (Rh) antara 70-80% (Malole dan Pramono 1989).

### **1.2.3.2 Perlakuan**

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) didasarkan pada asumsi percobaan mempunyai lingkungan yang homogen,

sehingga akan memberikan respons yang sama bila diberikan perlakuan serupa. Rancangan perlakuan adalah 5 kelompok perlakuan, 5 kali ulangan dan 3 tahap pengamatan. Penelitian menggunakan 25 ekor tikus putih. Lalu mengelompokkan tikus secara acak ke dalam 5 kelompok perlakuan dengan 5 kali ulangan. Membuat kelompok perlakuan berdasarkan perbedaan dosis lovastatin seperti terlihat pada Lampiran 2.2

Penelitian diawali dengan membuat semua tikus menjadi hiperkolesterolemia dengan cara memberikan pakan tikus berupa pelet ditambah minyak kelapa sebanyak 2,5 mL selama 14 hari (Zulfiana, 2003). Dilanjutkan dengan pemberian bahan uji, berupa ekstrak lovastatin dengan 3 dosis yang berbeda yaitu: 0,1, 0,2 dan 0,4 mg/hari selama 14 hari dengan cara dicekikkan menggunakan sonde lambung. Selama proses pemberian bahan uji, tikus-tikus diberikan pakan seperti biasa berupa pelet. Proses pengemulsian bahan uji menggunakan CMC 1% (b/v). Pemberian bahan uji satu kali sehari sebanyak 2,5 mL selama 14 hari berturut-turut, secara oral dengan menggunakan sonde lambung (Tanzawa *et al.* 1982) (Lampiran 2.3).

Selanjutnya melakukan analisis kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL darah tikus sebanyak 3 tahap, yaitu: sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa, serta sesudah perlakuan dengan pemberian bahan uji selama 14 hari.

### **1.2.3.3 Pembuatan sediaan bahan uji**

Pembuatan sediaan bahan uji dimulai dengan melakukan inokulasi terhadap *Asp. flavus* UICC 360 (Lampiran 2.4), yang terbukti menghasilkan lovastatin. Inokulasi dengan metode *streak* ke dalam 10 tabung reaksi berisi 5 mL medium PDA Biakan *Asp. flavus* UICC 360. Selanjutnya memasukkan ke dalam inkubator pada suhu ruang (26 – 29°C) selama 7 hari. Membuat Inokulum dengan menambahkan 5 mL akuades steril ke dalam isolat, lalu mengerik dengan ose, terakhir melakukan homogenisasi dengan vortex selama 30 detik.

Fermentasi menggunakan 30 buah Erlenmeyer 250 mL yang berisi 100 mL medium CDB pada pH 6,5. Menggunakan autoklaf untuk sterilisasi medium selama 15 menit pada suhu 121 °C. Lalu menambahkan 2 ml inokulum ( $3,5 - 4 \times 10^7$  cfu/ml) ke dalam Erlenmeyer berisi CDB, Proses inkubasi berlangsung pada

suhu 26–28°C, dalam *shaker inkubator* dengan kecepatan pengocokan 100 rpm selama 48 jam.

Setelah fermentasi, melakukan filtrasi kultur menggunakan kertas saring (Whatman no.1). Pertama menambahkan asam sulfat 2 N ke dalam filtrat sampai mencapai pH 3, lalu melakukan homogenisasi miselium. Selanjutnya menggabungkan kembali filtrat dan miselium, kemudian melakukan ekstraksi sebanyak 3 kali menggunakan corong pemisah. Ekstraksi menggunakan etil-asetat dalam jumlah yang sama dengan kultur. Setelah itu melakukan pengeringan dengan evaporator, akan diperoleh lovastatin dalam bentuk asam-β-hidroksi terbuka (Lampiran 2.5).

#### **1.2.3.4 Penetapan dosis sediaan bahan uji**

Menurut rekomendasi *National Cholesterol Education Program* (NCEP) dosis penggunaan lovastatin bagi manusia adalah 10 – 80 mg sehari. Berdasarkan rekomendasi tersebut dan untuk penggunaan pada tikus setelah melakukan konversi dengan mengalikan 0,018 (Shaw *et al.* 2008) maka perlakuan diberikan dengan setengah dosis (0,1 mg/hari), dosis normal (0,2 mg/hari) dan dua kali dosis normal (0,4 mg/hari).

#### **1.2.3.5 Pembuatan larutan bahan uji**

Larutan stok dibuat dengan melarutkan 4 mg bahan uji dengan 25 mL CMC 1%. Untuk dosis 0,4 mg mengambil langsung dari larutan stok sebanyak 12,5 mL (untuk 5 ekor tikus), untuk dosis 0,2 mg mengambil sebanyak 6,25 mL dari larutan stok lalu menambahkan dengan 6,25 mL CMC 1% sedangkan dosis 0,1 mg dibuat dengan mengambil sebanyak 3,125 mL larutan stok lalu menambahkan dengan 9,375 mL CMC 1%. Bahan uji dibuat baru setiap kali akan memberikan perlakuan.

#### **1.2.3.6 Analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan LDL dalam darah tikus.**

Darah diambil melalui pembuluh darah vena di ujung mata tikus dengan cara: tikus dibius dengan eter sampai lemas, tidak sampai mati. Tabung kapiler hematokrit dipatahkan, kemudian ditusukkan ke sinus orbitalis sampai darahnya mengalir melalui tabung kapiler. Kemudian darah ditampung dalam tabung eppendorf sebanyak 0,5 mL (Lampiran 2.6). Selanjutnya disentrifugasi dengan

kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Serum yang terbentuk dipisahkan untuk diukur kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL, dan LDL (Windayanthi, 2007)

Analisis kadar kolesterol total menggunakan metode *Cholesterol Enzymatic-colorimetric test* (CHOD-POD), analisis kadar trigliserida menggunakan metode *Tryglyceride Enzymatic* (GPO-Enzimatik), analisis kolesterol HDL menggunakan metode *HDL-cholesterol Phosphotungstic precipitation* dan analisis kolesterol LDL menggunakan rumus Friedwald (Cypress Diagnostic 2008)

Kolesterol total, trigliserida dan kolesterol HDL diukur setelah hidrolisis enzimatik dan oksidasi. Indikator *quinonimine* dibentuk dari hidrogen peroksidase dan 4-aminofenazone dalam fenol dan peroksidase. Prinsip reaksi analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan LDL tercantum pada Lampiran II. 7 A, B, dan C. Analisis dilakukan dengan mencampurkan sampel dan reagen sampai homogen, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 20 – 25°C sampai terjadi perubahan warna dari bening kekuningan menjadi merah muda. Pengukuran absorbansi sampel dan standart terhadap reagen blanko dilakukan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 500 nm dalam 60 menit. Kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dihitung dengan rumus seperti tercantum pada (Lampiran 2.8).

#### **1.2.3.7 Analisis Data**

Data hasil pengukuran kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus dianalisis menggunakan analisis ragam (Anova). Uji lanjut untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok perlakuan yang diberikan dilakukan dengan uji t untuk mengetahui Beda Nyata Terkecil (BNT) (Yitnosumarto, 1991)

## 2. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 2.1 Analisis data kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa.

Analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL, dan kolesterol LDL dalam darah tikus pertama kali adalah setelah proses aklimatisasi selama 14 hari, digunakan sebagai data awal. Selanjutnya analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL berikutnya yaitu setelah tikus-tikus tersebut menderita hiperkolesterolemia sebagai data kedua.

Dari hasil analisis data pertama dan kedua diperoleh data bahwa kolesterol total mengalami kenaikan (24,8%) menjadi 77,44 mg/dL dari awal 62,04 mg/dL, trigliserida juga meningkat (65,3%) dari 48 mL/dL menjadi 79,36 mL/dL, kolesterol HDL mengalami penurunan (2,95%) dari 33,8 mL/dL menjadi 32,8 mL/dL, sedangkan kolesterol LDL naik (30,26%) menjadi 28,16 mg/dL dari awal 19,64 mg/dL (Gambar 2.2).

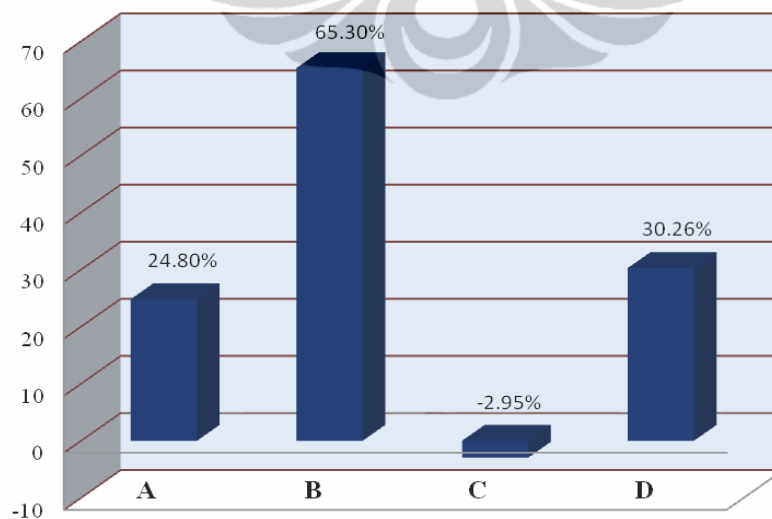
Hasil analisis statistik dengan uji t (Paired Samples Test) menunjukkan korelasi antara kadar kolesterol total, trigliserida, HDL dan LDL sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa. Peningkatan kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol LDL serta penurunan kadar kolesterol HDL sesudah pemberian minyak kelapa berbeda sangat nyata ( $p < 0,01$ ) dibandingkan sebelum diberikan minyak kelapa (Lampiran 2.9).

Minyak kelapa yang diberikan pada tikus mengandung asam lemak jenuh 82,2 g, sedangkan kandungan asam lemak tidak jenuhnya berupa asam oleat 9,9 g dan linoleat 3.2 g pada tiap 100 mL (Bagian GIZI RSCM dan Persatuan Gizi Indonesia. 1999). Pemberian minyak kelapa dalam penelitian adalah 2,5 mL perhari, dengan kandungan asam lemak jenuh sekitar 2055 mg. Jumlah asam lemak jenuh yang dianjurkan dalam makanan sehari-hari adalah tidak lebih dari 200 mg. Tingginya kandungan asam lemak jenuh dalam minyak kelapa, merupakan penyebab kenaikan kolesterol total, trigliserida dan kolesterol LDL dalam plasma darah tikus yang diuji. Menurut Grundy (1991) peningkatan konsumsi makanan dengan kadar kolesterol dari 200 mg menjadi 400 mg sehari dapat meningkatkan kadar kolesterol total dalam plasma darah sebanyak 5 mg/dL. Penelitian mengenai pengaruh minyak kelapa terhadap konsentrasi kolesterol

dalam plasma darah yang dilakukan oleh Schaefer *et al.* (1995) dilaporkan bahwa minyak kelapa tidak hanya menyebabkan perubahan kolesterol total, tetapi juga perubahan kolesterol HDL dan kolesterol LDL. Minyak kelapa mengakibatkan peningkatan konsentrasi kolesterol LDL dan menurunkan konsentrasi kolesterol HDL dalam plasma darah.

Hal tersebut disebabkan karena minyak kelapa, seperti halnya lemak dan minyak lainnya, tersusun atas trigliserida yang merupakan ester dari gliserol dengan tiga molekul asam lemak. Minyak kelapa mengandung lebih dari 80% asam lemak jenuh dapat menekan pembentukan reseptor *Low Density Lipoprotein* (LDL), sehingga meningkatkan jumlah kolesterol LDL yang beredar di dalam darah (Grundy 1991). Trigliserida merupakan komponen utama dari kilomikron dan juga berkaitan dengan metabolisme lipoprotein yang lain seperti *High Density Lipoprotein* (HDL). Menurut Fungwe *et al.* (1993) peningkatan trigliserida dalam hati dan darah adalah akibat dari pengurangan oksidasi asam lemak. Pada tikus yang dibuat hiperkolesterolemia terjadi kerusakan pada tempat-tempat khusus pembuatan reseptor LDL (Mayes 1983).

Kolesterol HDL mengalami penurunan hal tersebut disebabkan karena penyerapan asam lemak dalam usus mengakibatkan sintesis trigliserida, selanjutnya bergabung dengan kilomikron yang berasal dari kolesterol HDL, sehingga kadar kolesterol HDL mengalami penurunan (Brandt 2003).



Gambar 2.2 Perbandingan persentase rata-rata kadar A: kolesterol total, B: trigliserida, C: kolesterol HDL dan D: kolesterol LDL dalam darah tikus sesudah pemberian minyak kelapa.



## **2.2 Analisis kadar kolesterol total dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360.**

Berdasarkan hasil analisis data, pemberian bahan uji berupa ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 dapat menurunkan kadar kolesterol total dalam darah tikus. Hasil analisis statistik dengan Anova penurunan kadar kolesterol total tidak memperlihatkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ) (Lampiran 2. 9).

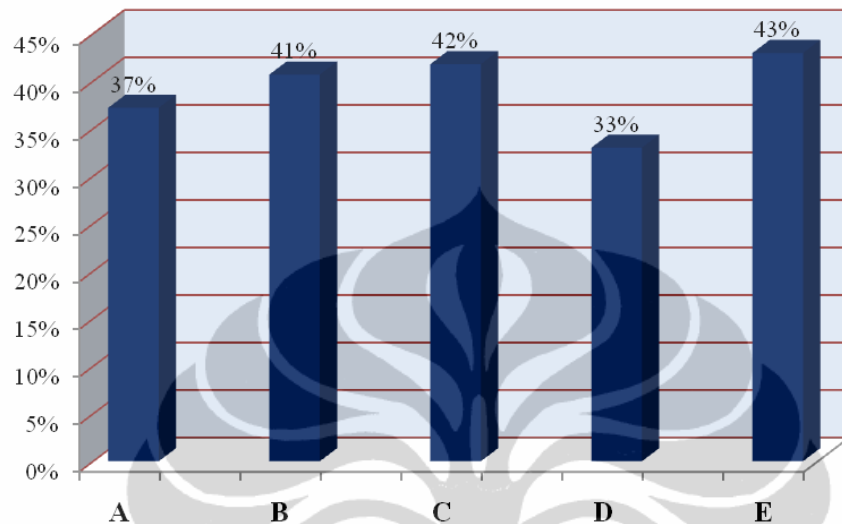
Rata-rata penurunan kadar kolesterol total dalam darah tikus kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) sebesar 37,19%. Kelompok perlakuan B (dosis 0,2 mg/hari) penurunan kadar kolesterol total sebesar 40,68%. Kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/hari) sebesar 41,78% adalah penurunan yang paling mendekati penurunan kadar kolesterol total pada kelompok perlakuan E (kontrol positif) sebesar 42,95%. Kelompok perlakuan D (kontrol negatif) juga memperlihatkan penurunan sebesar 32,99% (Tabel 2. 1 dan Gambar 2. 3).

Penurunan pada kontrol negatif disebabkan karena tubuh memiliki mekanisme autoregulasi atau pengaturan untuk mempertahankan kadar kolesterol supaya tetap normal. Kolesterol sebagian besar disintesis dalam organ hati (80%), ketika jumlah kolesterol yang masuk lewat makanan berlebih maka hati dan usus akan menekan sintesis kolesterol (Marthin *et al.* 1983).

Lovastatin merupakan senyawa penting untuk mengatasi penyakit hiperkolesterolemia karena aktivitasnya mampu menghambat hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktase, yang berfungsi sebagai katalis dalam biosintesis kolesterol (Alberts *et al.* 1980). Biosintesis kolesterol juga dikontrol oleh konsentrasi protein khusus pembawa lipid yaitu lipoprotein. Kecepatan biosintesis kolesterol juga dihambat jika lipoprotein yang mengandung kolesterol berikatan dengan reseptor pada permukaan sel.

HMG-Ko-A reduktase adalah enzim utama yang akan mengubah HMG-KoA menjadi mevalonat, pada saat lovastatin dalam bentuk asam-  $\beta$ -hidroksi berada pada konsentrasi yang lebih tinggi daripada konsentrasi HMG-KoA maka HMG-KoA reduktase akan memilih berikatan dengan lovastatin sehingga proses pembentukan mevalonat tidak terjadi dan akibatnya proses pembentukan kolesterol terhambat (Tobert 2003).

Tanzawa *et al.* (1982) melaporkan pemberian statin pada tikus sebanyak 10 mg/kg berat badan diberikan secara oral akan menurunkan kadar kolesterol total sebesar 22,4%, dibandingkan dengan kontrol yang kadar kolesterolnya dinaikkan dengan Triton WR-1339.



Gambar 2.3 Perbandingan persentase rata-rata penurunan kolesterol total sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif)

### 2.3 Analisis kadar trigliserida dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360.

Penurunan kadar trigliserida pada kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) adalah 61,76% lebih tinggi dari penurunan kadar trigliserida pada kelompok perlakuan E (kontrol positif) yaitu 54,40%. Kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) dan B (dosis 0,2 mg/hari) juga menunjukkan penurunan kadar trigliserida meskipun masih dibawah kelompok kontrol positif .

Hasil analisis statistik uji LSD menunjukkan bahwa penurunan kadar trigliserida yang paling berbeda pada ( $p < 0,01$ ) adalah antara kelompok D (kontrol negatif) dengan kelompok A (dosis 0,1 mg/hari) dan kelompok C (dosis 0,4 mg/hari), tetapi jika dilihat dari *mean difference* pada tingkat signifikansi pada ( $\alpha = 0,05$ ) yang paling berbeda nyata adalah antara kelompok D (kontrol negatif) dengan kelompok A (dosis 0,1 mg/hari) (Lampiran 2.11).

Hasil analisis statistik dengan uji LSD dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 dengan dosis A (0,1 mg/hari) dapat menurunkan kadar trigliserida sampai sebesar 61,76% (Tabel 2.1 dan Gambar 2.4).

Trigliserida adalah bentuk asam lemak yang disimpan dalam jaringan adiposa. Trigliserida digunakan oleh tubuh sebagai sumber energi dan komponen penyusun sel. Trigliserida bersumber dari lemak dalam makanan serta hasil sintesis karbohidrat dan protein dalam organ hati. Meskipun dibutuhkan oleh tubuh, kadar trigliserida yang terlalu tinggi dalam darah dapat menjadi faktor risiko penyakit jantung. Pada umumnya, tingkat normal trigliserida adalah di bawah 150 mg/dL. (LeBaron 2006).

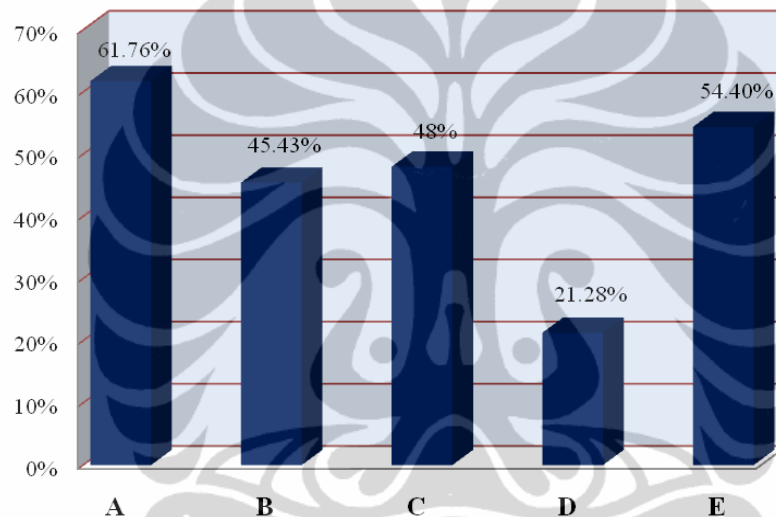
Proses oksidasi atau esterifikasi dapat membatasi jumlah trigliserida. Proses Oksidasi sempurna asam lemak menghasilkan energi sebesar 9 kkal/g dibandingkan karbohidrat dan protein yang menghasilkan energi sebesar 4 kkal/g. Proses oksidasi asam lemak merupakan proses yang terjadi di mitokondria di mana terjadi pada atom karbon beta sehingga disebut beta oksidasi. Setiap kali oksidasi menghasilkan asetil KoA, NADH dan FADH<sub>2</sub>.

Tahap awal penggunaan lemak sebagai sumber energi adalah proses lipolisis yaitu hidrolisis trigliserida oleh lipase yang akan menghasilkan gliserol dan asam lemak. Aktivitas enzim lipase pada sel adipose diatur oleh beberapa hormon antara lain: epinefrin, norepinefrin, glukagon dan hormon adrenokortikotropik mengaktifkan adenilat siklase di dalam sel adiposa dengan cara memicu reseptor- reseptor. Pemberian lovastatin menyebabkan penurunan kadar trigliserida karena salah satu pengaruh pemberian lovastatin adalah mengaktifkan pembentukan reseptor sehingga meningkatkan aktivitas enzim lipase.

Heber (1999) melaporkan penelitian yang melibatkan sebanyak 83 orang penderita hiperkolesterolemia, mengalami penurunan kadar LDL dan trigliserida, setelah minum angkak merah selama 12 minggu, sebanyak 2,4 g/100 ml. Di daratan Cina, konsumsi beras angkak (beras merah hasil fermentasi dari *Monascus purpureus*) telah dibuktikan dapat mengurangi kadar kolesterol (11–32%) dan konsentrasi trigliserida (12–19%). Menurut penelitian Kasim *et al.* (2005);

Zulfiana (2003), proses fermentasi beras angkak dengan kapang *Monascus purpureus* terbukti menghasilkan lovastatin.

Pengobatan menggunakan lovastatin dapat menurunkan trigliserida, kolesterol bebas, dan VLDL. Pada tikus yang diberi perlakuan dengan lovastatin, kolesterol total (6,4 mg/dL) dan kolesterol bebas (8,6 mg/dL) sedikit lebih rendah dibandingkan tikus yang diberikan placebo (masing-masing 5.1 mg/dL dan 6.2 mg/dL) kelompok perlakuan lovastatin). Sedangkan trigliserida untuk kelompok perlakuan dengan lovastatin (32,2 mg/dL) dan dengan placebo (25,7 mg/dL) (Kasim *et al.* 1992).



Gambar 2.4. Perbandingan persentase rata-rata penurunan trigliserida sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari), B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif)

#### 2.4 Analisis kadar *high density lipoprotein* (HDL) dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360.

Hasil analisis kadar kolesterol HDL setelah pemberian ekstrak lovastatin pada kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) terjadi peningkatan rata-rata kadar kolesterol HDL sebesar 0,4 mg/dL (1,1%), kelompok perlakuan B (dosis 0,2 mg/hari) sebesar 1 mg/dL (3 %) dan perlakuan C (dosis 0,4 mg/hari) sebesar 3 mg/dL (9,2%) dari tiga dosis tersebut yang paling banyak meningkatkan

kolesterol HDL adalah kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/hari) lebih tinggi dari rata-rata peningkatan kadar kolesterol HDL oleh kelompok perlakuan E (kontrol positif) peningkatan sebesar 1,6 mg/dL (4,7%). Hasil analisis tersebut menunjukkan pemberian ekstrak lovastatin terbukti dapat meningkatkan kadar kolesterol HDL, namun berdasarkan hasil analisis statistik dengan Anova menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan dalam peningkatan kadar kolesterol HDL dengan pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) (Lampiran 2.12).

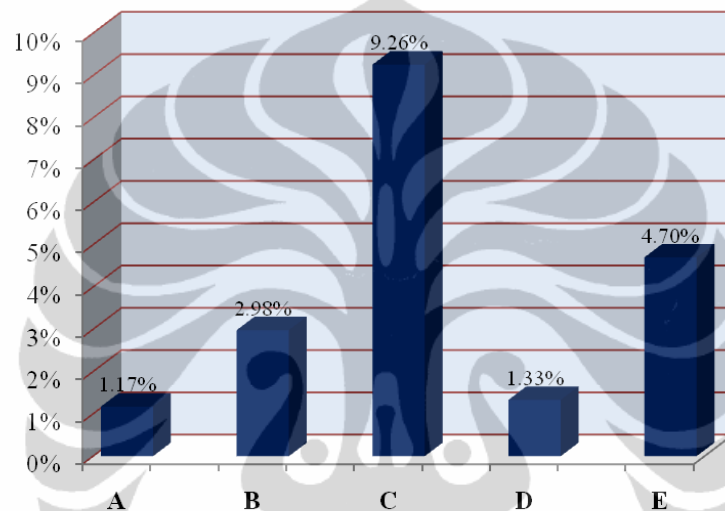
Hal tersebut mungkin berhubungan dengan populasi tikus yang kurang homogen, perbedaan pengaruh lemak jenuh dan tak jenuh, dosis ekstrak lovastatin yang digunakan, atau pengaruh komponen diet selain lemak, dalam mempengaruhi peningkatan kadar kolesterol HDL. Selain itu, waktu penelitian yang berlangsung selama 14 hari, mungkin belum berpengaruh dalam meningkatkan kolesterol HDL secara signifikan.

Kolesterol HDL disintesis di hati dan usus kecil. Kolesterol HDL yang dibentuk oleh hati terdiri dari apoprotein dan kolesterol bebas (Mayes 1983). Kolesterol HDL dapat mencegah penyakit atherosklerosis karena berfungsi sebagai pengangkut kelebihan kolesterol dari jaringan ke hati. Kelebihan tersebut akan diubah menjadi asam empedu dan diekskresikan. Pada manusia tingkat kadar kolesterol HDL berbanding terbalik dengan penyakit atherosklerosis (Daniels *et al.* 2009). Kadar kolesterol HDL yang terlalu rendah ( $< 40$  mg/dL untuk laki-laki dan  $< 50$  mg/dL untuk perempuan) adalah faktor resiko penyakit kardiovaskular. Pengobatan dengan HMG-KoA reduktase inhibitor (Statin) berpengaruh relatif kecil terhadap peningkatan kadar HDL, dan rendahnya kadar kolesterol HDL sering berlanjut meskipun dilakukan pengobatan dengan statin. Penggunaan intervensi tambahan yang dirancang untuk meningkatkan kadar kolesterol HDL adalah dengan menggunakan *nicotinic acid (niacin)* (McGovern 2005).

Menurut *American Hospital Formulary Service (AHFS) Drug Information* (2009) dibandingkan niacin atau turunan asam fibric (gemfibrozil) lovastatin mampu mengurangi kadar kolesterol total dan kolesterol LDL tetapi kurang efektif dalam mengurangi peningkatan konsentrasi trigliserida atau kolesterol HDL.

Berkaitan dengan pemberian lovastatin yang menyebabkan terhambatnya biosintesis kolesterol maka terjadi peningkatan rasio perbandingan antara protein dengan kepadatan lipoprotein, maka HDL yaitu lipoprotein yang rasio perbandingan antara protein dengan kepadatan lipoproteinnnya sangat tinggi yaitu 50%, dibandingkan dengan rasio perbandingan antara protein dengan kepadatan lipoprotein pada kilomikron yang hanya 2%.

Rata-rata kadar kolesterol HDL dalam darah tikus setelah perlakuan serta persentase peningkatannya dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Gambar 2.5.



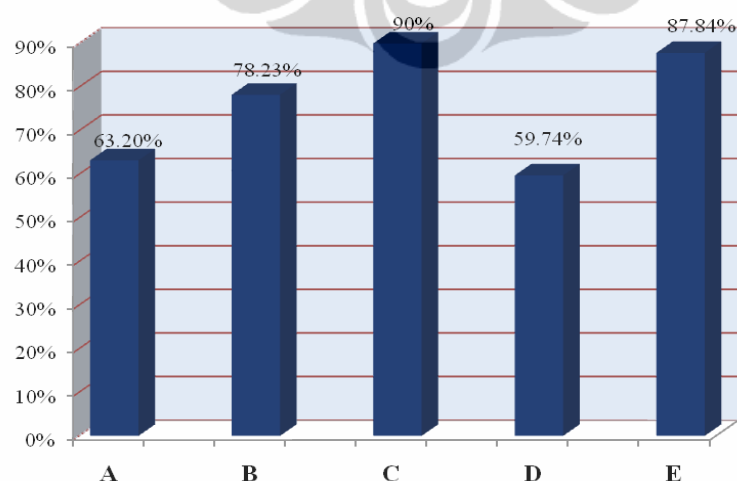
Gambar 2.5 Perbandingan persentase rata-rata peningkatan kolesterol HDL sesudah pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif)

## 2.5 Analisis kadar kolesterol *low density lipoprotein* (LDL) dalam darah hewan uji setelah pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360.

Hasil analisis kadar kolesterol LDL setelah pemberian ekstrak lovastatin pada kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) terjadi penurunan rata-rata kadar kolesterol LDL terkecil yaitu 63,20%. Sedangkan penurunan rata-rata kadar LDL terbesar terjadi pada kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/dL) lebih besar dari penurunan rata-rata kolesterol LDL pada kelompok kontrol positif yaitu 90%. Berdasarkan hasil analisis statistik perbedaan perlakuan dalam penurunan kadar kolesterol LDL dengan pemberian ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 menunjukkan perbedaan yang nyata ( $p > 0,05$ ) (Lampiran 2.13)

Kolesterol LDL dibentuk dari *Very Low Density Lipoprotein* (VLDL) dan kilomikron. Mekanisme penurunan kolesterol LDL oleh lovastatin karena lovastatin menyebabkan terjadinya penurunan konsentrasi VLDL dan meningkatkan pembentukan reseptor LDL. Hal tersebut akan menyebabkan penurunan produksi dan atau peningkatan katabolisme kolesterol LDL. Setiap partikel kolesterol LDL mengandung satu molekul apolipoprotein B, lovastatin juga menyebabkan berkurangnya jumlah apolipoprotein, hal tersebut membuktikan bahwa lovastatin tidak hanya menyebabkan kolesterol LDL berkurang, tetapi juga mengurangi konsentrasi sirkulasi partikel kolesterol LDL.

Menurut Grundy (1991) penurunan LDL dalam plasma darah dapat disebabkan antara lain karena penghambatan sintesis kolesterol ester di organ hati, peningkatan kolesterol bebas dari inaktif menjadi aktif, dan pengaturan produksi oxysterol. Ganong (1995) melaporkan bahwa adanya hormon tiroid dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara peningkatan pembentukan reseptor *low density lipoprotein* (LDL). Pemberian lovastatin sebagai pengendali enzim dalam biosintesis kolesterol dapat merangsang ekspresi reseptor LDL yang berakibat pada penurunan kadar kolesterol LDL dalam plasma darah (Krieger 1998). Ekspresi dari reseptor LDL penting dalam pengaturan dan pemeliharaan kadar kolesterol dalam sel (Grundy 1991). Rata-rata kadar LDL kolesterol dalam darah tikus setelah pemberian perlakuan serta persentase penurunannya dapat dilihat pada Tabel 2.1 dan Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Perbandingan persentase rata-rata penurunan kolesterol LDL sesudah pemberian perlakuan perlakuan A (0,1 mg/hari), B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif)

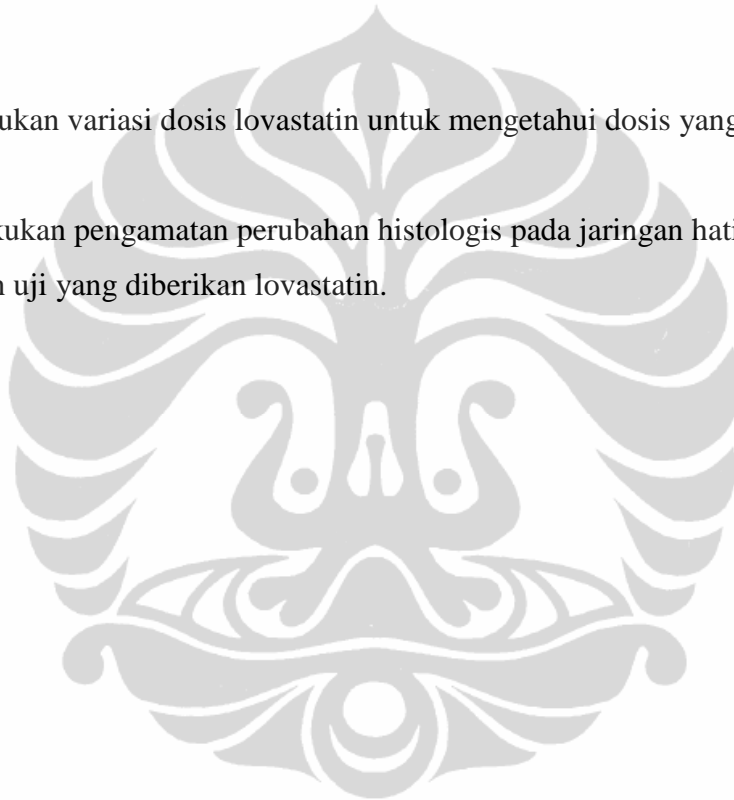
### **3. KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **3.1 KESIMPULAN**

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak lovastatin *Asp. flavus* UICC 360, dicekokkan pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L. galur *Sprague Dawley*, pada dosis 0,1; 0,2 dan 0,4 mg/hari tidak menurunkan kadar kolesterol total serta tidak meningkatkan HDL, pada dosis 0,2 mg/hari menurunkan trigliserida sampai (61,76%), pada dosis 0,4 mg/hari dapat menurunkan kadar LDL (90%)

#### **3.2 SARAN**

1. Perlu dilakukan variasi dosis lovastatin untuk mengetahui dosis yang paling tepat.
2. Perlu dilakukan pengamatan perubahan histologis pada jaringan hati dan ginjal dari hewan uji yang diberikan lovastatin.





Tabel 2.1 Rata-rata hasil analisis laboratorium kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL dalam darah tikus.

Perlakuan		Kadar Kolesterol Total			Kadar Trigliserida			Kadar Kolesterol HDL			Kadar Kolesterol LDL		
		I	II	Penurunan	I	II	Penurunan	I	II	Peningkatan	I	II	Penurunan
A	Ekstrak lovastatin 0,1 mg + CMC 0,1%	76,6	47,8	28,8±3,6 (37,19%)	91	34,6	56,2±6,6 (61,76%)	34	34,4	0,4 (1,17%)	25	9,2	15,8±3,4 (63,20%)
B	Ekstrak lovastatin 0,2 mg + CMC 0,1%	76,2	45,2	31±5,8 (40,68%)	76,6	41,8	34,8±11,4 (45,43%)	33,6	34,4	1 (2,98%)	29,4	6,4	23±3,0 (78,23%)
C	Ekstrak lovastatin 0,4 mg + CMC 0,1%	71,8	41,8	30±9,6 (41,78%)	85,4	44,4	41±12,6 (48%)	32,4	35,4	3 (9,26%)	26	2,6	23,4±5,9 (90%)
D	Kontrol CMC 0,1%	78,8	52,8	26±3,2 (32,99%)	78	62,4	15,6±5,2 (21,28%)	30	30,4	0,4 (1,33%)	30,8	12,4	18,4±5,9 (59,74%)
E	Kontrol Lovastatin murni 0,2 mg + CMC 0,1%	83,8	47,8	36±10,8 (42,95%)	65,8	28	35,8±8,3 (54,40%)	34	35,6	1,6 (4,70%)	29,6	3,6	26±6,3 (87,84%)

Keterangan: Pemberian perlakuan A (0,1 mg/hari, B (0,2 mg/hari), C (0,4 mg/hari), D (kontrol negatif) dan E (kontrol positif).

I = kadar kolesterol setelah pencekakan minyak kelapa, II = kadar kolesterol setelah pemberian ekstrak lovastain

## DAFTAR ACUAN

- Adaramoye, O.A., Nwaneri V.O., Anyanwu K.C., Farombi, E.O. & Emerole, G.O. 2005. Possible antiatherogenic effect of kolaviron (a *Garcinia kola* seed extract) in hypercholesterolemic rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 32 (1) 40–46.
- AHFS Drug Information. (CR) Copyright, 1959-2010, Selected Revisions January 2009. *American Society of Health-System Pharmacists, Inc.*, 7272 Wisconsin Avenue, Bethesda, Maryland 20814.
- Atalla, M. M., Hamed, E. R. & A.R. El-Shami, 2008. Optimization of a culture medium for increased mevinolin production by *Asp. terreus* strain. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2): 6- 10.
- Bagian Gizi RSCM dan Persatuan Ahli Gizi Indonesia. 1999. Penuntun Diet. P.T. Gramedia, Pustaka Utama.
- Daniels, T.F., K.M. Killinger, J.J. Michal, R.W. Wright Jr & Zhihua Jiang. 2009. Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health. *International Journal of Biological Science*, 5 (5):474-488.
- Fungwe, T. V., L. M. Cagen, G. A. Cook, H. G. Wilcox & M. Heimberg. Dietary cholesterol stimulates hepatic biosynthesis of triglyceride and reduces oxidation of fatty acids in the rat. *Journal of Lipid Research*. 1993. 34:933-941.
- Ganong, W.F. 1995. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi ke 17. Penerjemah. Widjajakusumah. M. Dj. EGC.Jakarta.
- Grundy, S.M. 1991. Multifactorial etiology of hypercholesterolemia: implication for prevention of coronary heart disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, 11: 1619-1635.
- Hyun Kyo Lim, Woosung Shin, Ji Yeon Lee & Sungwoo Ryoo. 2009. Native low-density lipoprotein-induced superoxide anion contributes to proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Korean Journal Anesthesiology*, 57(5): 622-628.

- Kasim, E. S., R.C. Le Boeuf, S. Wilnani, L. Tallapaka, D. Dayauanda. & K. L. C. Jen. 1992. Mechanisms of triglyceride-lowering effect of an HMG-CoA reductase inhibitor in a hypertriglyceridemic animal model, the Zucker obese rat. *Journal of Lipid Research*. 33: 1-7
- Kasim, E., Y. Kurniati., & N. Nurhidayat., 2006. Pemanfaatan Isolat lokal *Monascus purpureus* untuk menurunkan kolesterol darah pada tikus galur *Sprague Dawley*. *Biodiversitas*. 7 (2) 123-126.
- Krieger, M. 1998. The best of cholesterols, the worst of cholesterols: a tale of two receptors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95:4077-80.
- LeBaron, F. 2006. Utilization and storage of energy in lipid form. *Dalam: T.M. Devlin (ed).2006. Textbook of biochemistry with clinical correlations*. John Wiley & Son. Inc., New York:440-485.
- Malole, M.B. & C.S.V. Pramono. 1989. Penggunaan hewan-hewan percobaan laboratorium. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Pusat Antar Universitas Bioteknologi IPB. Bogor: vii+161.
- McGovern, M. 2005. Niaspan<sup>®</sup>: creating a new concept for raising HDL-cholesterol. *European Heart Journal Supplements*: 7: F41-F47
- Mahfouz, M.M. & F.A Kumerrow,. 2000. Cholesterol rich diets have different effect on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in Rats and Rabbits. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 11 (5):293-302.
- Manzoni, M. S. Bergomi, M. Rollini & V. Cavazzoni. 1999. Production of statins by filamentous fungi. *Biotechnology Letters* **21**: 253–257.
- Manzoni, M. & M. Rollini. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**: 555–56
- Martin Jr., D.W., Mayes, P.A. & V.W. Rodwell. 1983. *Biokimia (Review of Biochemistry)* .Ed. 19. Alih bahasa: Dharma, A. dan A.S.Kurniawan. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. xii+686.

- Mayes, P.A. 1983. Metabolisme Lipid II Peranan Jaringan. *Dalam: Martin Jr., D.W., Mayes, P.A. & V.W. Rodwell. 1983. Biokimia (Review of Biochemistry) .Ed. 19. Alih bahasa: Dharma, A. dan A.S.Kurniawan. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. xii+686.*
- Samiee, S.M., N. Moazami & S. Haghghi. 2003. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal. 7(1): 29-33.*
- Schaefer E.J., A.H.Lichtenstein, S. L. Fava, J.R. Mc Namara & J.M. Ordova.1995. Lipoproteins, nutrition, aging and atherosclerosis. *American Journal of Clinical Nutrition, 61:726S-740S.*
- Shaw, R.S., M. Nihal & N. Ahmad. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 22:659-661.*
- Tanzawa, K., S. Iwado & Y. Tsujita. 1982. Preparation of monacolin K. US Patent. 4.223,648.
- Windayanthi, W. 2007. *Analisis kandungan ergosterol dalam biomassa kering Rhizopus dan tempe kedelai serta potensi ergosterol dalam menurunkan kadar lemak darah tikus.* Tesis Magister Sains. Program Studi Biologi. Program Pasca Sarjana, Universitas Indonesia, Depok, iii+128.
- Yitnosumarto, S. 1991. *Percobaan Perancangan, analisis, dan interpretasinya.* Gramedia, Jakarta: x+298.
- Zulfiana, D. 2003. *Tepung tempe sebagai substrat alternatif untuk memproduksi statin dalam menurunkan kolesterol darah tikus.* Tesis Magister Sains. Program Studi Biologi. Program Pasca Sarjana, Universitas Indonesia, Depok, xi-66.

Lampiran 2.1 Komposisi nutrisi dalam pelet hewan percobaan

No	Bahan Dasar Pakan Tikus
1.	Bungkil kedele
2.	Bungkil kepala
3.	Dedak
4.	Jagung
5.	Menir
6.	Minyak nabati
7.	Tapoioka
8.	Tepung Ikan
9.	Tepung rumput

No	Komposisi Pakan Tikus	% (100g)
1.	Protein	20—22
2.	Lemak	2—4
3.	Serat	4
4.	Abu	7-9

(Sumber: C.V. Kasman, 2007)

Lampiran 2.2 Kelompok perlakuan berdasarkan perbedaan dosis lovastatin

No	Kelompok Perlakuan	Jumlah Hewan
A	Ekstrak lovastatin 0,1 mg + CMC 0,1%	5
B	Ekstrak lovastatin 0,2 mg + CMC 0,1%	5
C	Ekstrak lovastatin 0,4 mg + CMC 0,1%	5
D	Kontrol CMC 0,1%	5
E	Kontrol lovastatin murni 0,2 mg + CMC 0,1%	5

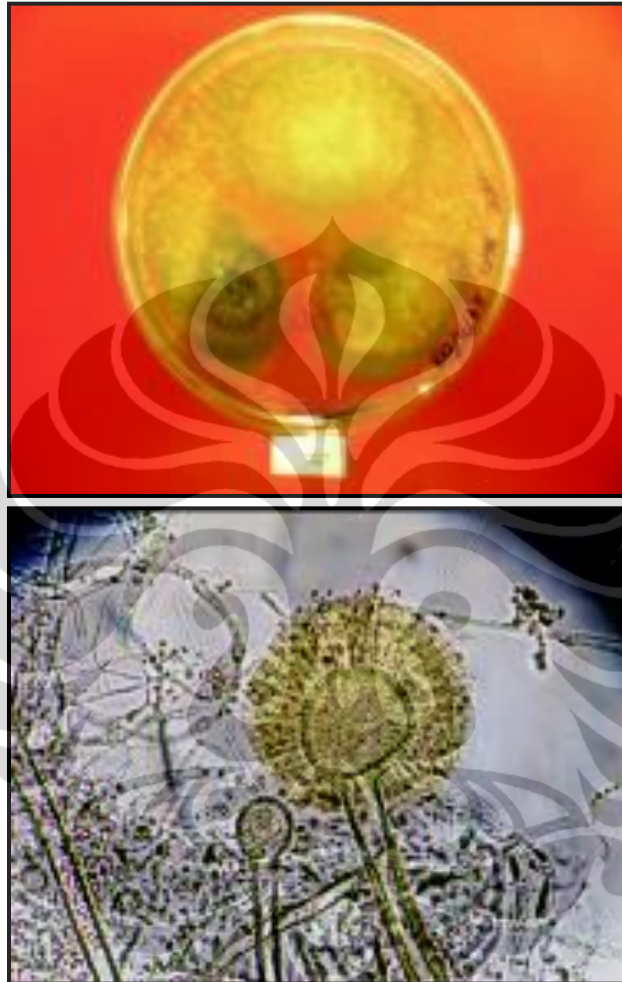
Lampiran 2.3 Gambar pemberian ekstrak lovastatin secara oral menggunakan alat sonde lambung



Sumber: (Dokumen pribadi)

Lampiran 2.4 Hasil pengamatan makroskopis dan mikroskopis *Aspergillus flavus*

UICC 360



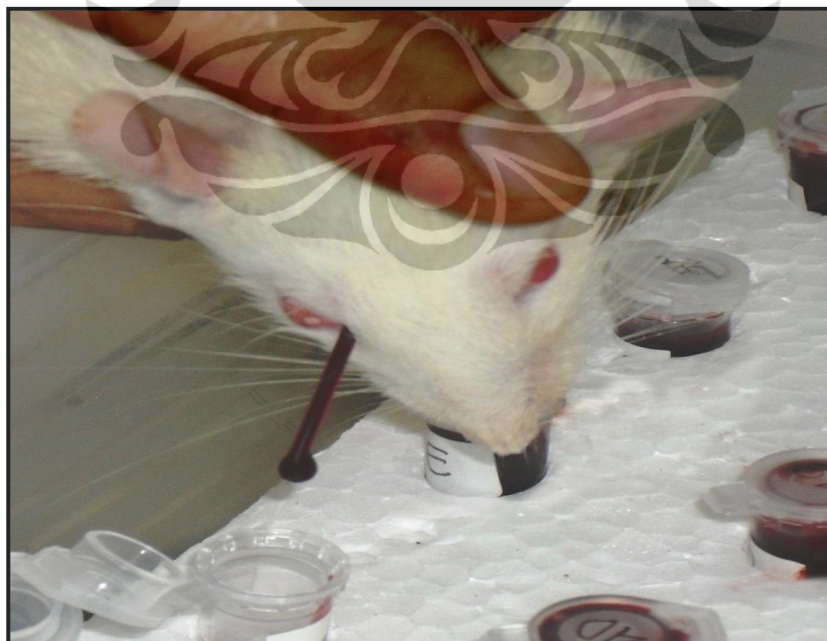
Sumber: (Dokumen pribadi)

Lampiran 2.5 Ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Aspergillus flavus* UICC 360



Sumber: (Dokumen pribadi)

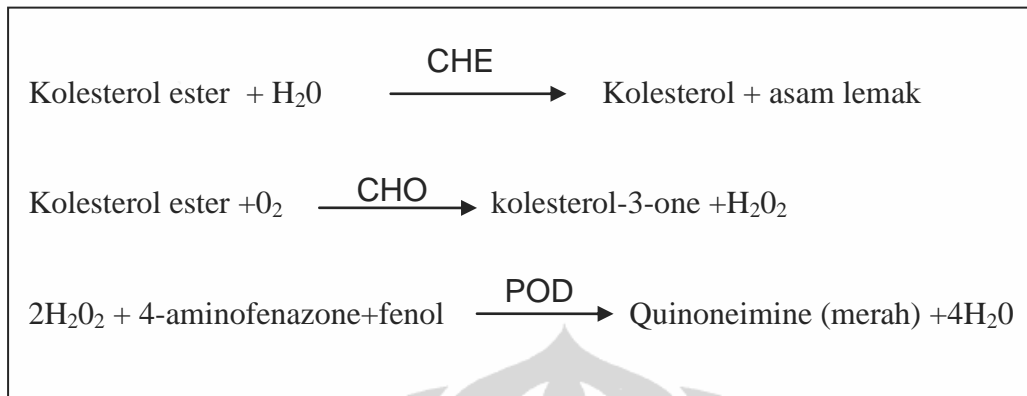
Lampiran 2.6 Pengambilan darah pada tikus melalui sinus orbitalis



Sumber: (Dokumen pribadi)



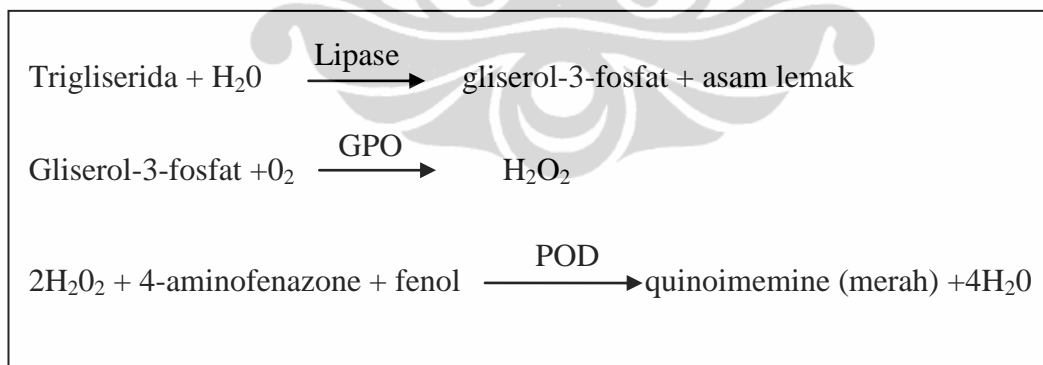
Lampiran 2.7 A Prinsip reaksi analisis kadar kolesterol total



Keterangan : CHE = Cholesterol esterase,  
CHO = cholesterol oxidase  
POD = Peroxidase

[Sumber : Cypress Diagnostics 2008]

Lampiran 2.7 B Prinsip reaksi analisis kadar trigliserida



[Sumber : Cypress Diagnostics 2008]

### Lampiran 2.7 C Prinsip reaksi analisis kadar HDL

LDL dan VLDL secara khusus diendapkan oleh asam phosphotungstic dan ion magnesium, kemudian dihilangkan dengan sentrifugasi. High density lipoprotein (HDL) tetap berada dalam supernatan. Penentuan HDL kolesterol dilakukan dengan menggunakan supernatan yang sudah jernih.

### Lampiran 2.8 Rumus perhitungan kadar kolesterol total dan trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL

$$\begin{aligned} \text{Kadar kolesterol} &= 200 \times \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standart}} \quad (\text{mg/dL}) \\ \text{Kadar trigliserida} &= 160 \times \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standart}} \quad (\text{mg/dL}) \\ \text{Kadar HDL} &= 50 \times \frac{\text{Absorban sampel}}{\text{Absorban standart}} \quad (\text{mg/dL}) \\ \text{Kadar LDL} &= \text{Kolesterol total} - (\text{Trigliserida}/5) - \text{Kolesterol HDL} \end{aligned}$$

Lampiran 2.9 Hasil uji t (*Paired sample test*) Kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL, kolesterol LDL sebelum dan sesudah pemberian minyak kelapa dengan SPSS 15.0.

**Paired Samples Statistics**

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	KolesterolTotalAwal	62,0400	25	8,91385	1,78277
	KolesterolTotalAkhir	77,4400	25	8,68466	1,73693
Pair 2	TrigliseridaAwal	48,0000	25	10,65364	2,13073
	TrigliseridaAkhir	79,3600	25	15,46469	3,09294
Pair 3	HDLAwal	33,8000	25	4,32049	,86410
	HDLAkhir	32,8000	25	4,82183	,96437
Pair 4	LDLAwal	19,6400	25	4,18210	,83642
	LDLakhir	28,1600	25	5,45955	1,09191

**Paired Samples Correlations**

		N	Correlation	Sig.
Pair 1	KolesterolTotalAwal & KolesterolTotalAkhir	25	,775	,000
Pair 2	TrigliseridaAwal & TrigliseridaAkhir	25	,510	,009
Pair 3	HDLAwal & HDLakhir	25	,848	,000
Pair 4	LDLAwal & LDLakhir	25	,722	,000

**Paired Samples Test**

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	KolesterolTotalAwal - KolesterolTotalAkhir	-15,40000	5,90903	1,18181	-17,83913	-12,96087	-13,031	24	,000
Pair 2	TrigliseridaAwal - TrigliseridaAkhir	-31,36000	13,58884	2,71777	-36,96920	-25,75080	-11,539	24	,000
Pair 3	HDLAwal - HDLakhir	1,00000	2,56580	,51316	-,05911	2,05911	1,949	24	,063
Pair 4	LDLAwal - LDLakhir	-8,52000	3,78726	,75745	-10,08330	-6,95670	-11,248	24	,000

Lampiran 2.10 Hasil analisis ANOVA data kolesterol total dengan SPSS 15.0.

Tests of Normality

Kolesterol Total	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	,184	25	,028	,926	25	,069

a. Lilliefors Significance Correction

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2,212	4	20	,104

ANOVA

KolTotal

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		268,960	4	67,240	1,270	,315
	Linear Term	Contrast	44,180	1	44,180	,835	,372
		Deviation	224,780	3	74,927	1,415	,268
Within Groups			1058,800	20	52,940		
Total			1327,760	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: KolTotal

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1,00	2,00	-2,20000	4,60174	,638	-11,7991	7,3991
		3,00	-1,20000	4,60174	,797	-10,7991	8,3991
		4,00	2,80000	4,60174	,550	-6,7991	12,3991
		5,00	-7,20000	4,60174	,133	-16,7991	2,3991
	2,00	1,00	2,20000	4,60174	,638	-7,3991	11,7991
		3,00	1,00000	4,60174	,830	-8,5991	10,5991
		4,00	5,00000	4,60174	,290	-4,5991	14,5991
		5,00	-5,00000	4,60174	,290	-14,5991	4,5991
	3,00	1,00	1,20000	4,60174	,797	-8,3991	10,7991
		2,00	-1,00000	4,60174	,830	-10,5991	8,5991
		4,00	4,00000	4,60174	,395	-5,5991	13,5991
		5,00	-6,00000	4,60174	,207	-15,5991	3,5991
	4,00	1,00	-2,80000	4,60174	,550	-12,3991	6,7991
		2,00	-5,00000	4,60174	,290	-14,5991	4,5991
		3,00	-4,00000	4,60174	,395	-13,5991	5,5991
		5,00	-10,00000*	4,60174	,042	-19,5991	-4,009
	5,00	1,00	7,20000	4,60174	,133	-2,3991	16,7991
		2,00	5,00000	4,60174	,290	-4,5991	14,5991
		3,00	6,00000	4,60174	,207	-3,5991	15,5991
		4,00	10,00000*	4,60174	,042	,4009	19,5991

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 2.11 Hasil analisis ANOVA data trigliserida dengan SPSS  
15.0

Tests of Normality

Trigliserida	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	,095	25	,200(*)	,971	25	,682

\* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

Trigliserida

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
,835	4	20	,519

ANOVA

Trigliserida

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		4241,840	4	1060,460	12,406	,000
	Linear Term	Contrast	1800,000	1	1800,000	21,058	,000
		Deviation	2441,840	3	813,947	9,522	,000
Within Groups			1709,600	20	85,480		
Total			5951,440	24			

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Trigliserida

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1,00	2,00	21,40000*	5,84739	,002	9,2026	33,5974
		3,00	15,20000*	5,84739	,017	3,0026	27,3974
		4,00	40,60000*	5,84739	,000	28,4026	52,7974
		5,00	20,40000*	5,84739	,002	8,2026	32,5974
	2,00	1,00	-21,40000*	5,84739	,002	-33,5974	-9,2026
		3,00	-6,20000	5,84739	,302	-18,3974	5,9974
		4,00	19,20000*	5,84739	,004	7,0026	31,3974
		5,00	-1,00000	5,84739	,866	-13,1974	11,1974
	3,00	1,00	-15,20000*	5,84739	,017	-27,3974	-3,0026
		2,00	6,20000	5,84739	,302	-5,9974	18,3974
		4,00	25,40000*	5,84739	,000	13,2026	37,5974
		5,00	5,20000	5,84739	,384	-6,9974	17,3974
	4,00	1,00	-40,60000*	5,84739	,000	-52,7974	-28,4026
		2,00	-19,20000*	5,84739	,004	-31,3974	-7,0026
		3,00	-25,40000*	5,84739	,000	-37,5974	-13,2026
		5,00	-20,20000*	5,84739	,003	-32,3974	-8,0026
	5,00	1,00	-20,40000*	5,84739	,002	-32,5974	-8,2026
		2,00	1,00000	5,84739	,866	-11,1974	13,1974
		3,00	-5,20000	5,84739	,384	-17,3974	6,9974
		4,00	20,20000*	5,84739	,003	8,0026	32,3974

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 2.12 Hasil analisis ANOVA data kolesterol HDL dengan SPSS 15.0

**Tests of Normality**

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
HDL Kolesterol	,138	25	,200(*)	,963	25	,471

\* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

HDL

Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
3,417	4	20	,028

**ANOVA**

HDL

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		23,440	4	5,860	,290	,881
	Linear Term	Contrast	1,620	1	1,620	,080	,780
		Deviation	21,820	3	7,273	,360	,782
Within Groups			403,600	20	20,180		
Total			427,040	24			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: HDL

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1,00	2,00	-,60000	2,84113	,835	-6,5265	5,3265
		3,00	-2,60000	2,84113	,371	-8,5265	3,3265
		4,00	,00000	2,84113	1,000	-5,9265	5,9265
		5,00	-1,20000	2,84113	,677	-7,1265	4,7265
	2,00	1,00	,60000	2,84113	,835	-5,3265	6,5265
		3,00	-2,00000	2,84113	,490	-7,9265	3,9265
		4,00	,60000	2,84113	,835	-5,3265	6,5265
		5,00	-,60000	2,84113	,835	-6,5265	5,3265
	3,00	1,00	2,60000	2,84113	,371	-3,3265	8,5265
		2,00	2,00000	2,84113	,490	-3,9265	7,9265
		4,00	2,60000	2,84113	,371	-3,3265	8,5265
		5,00	1,40000	2,84113	,628	-4,5265	7,3265
4,00	1,00	,00000	2,84113	1,000	-5,9265	5,9265	
	2,00	-,60000	2,84113	,835	-6,5265	5,3265	
	3,00	-2,60000	2,84113	,371	-8,5265	3,3265	
	5,00	-1,20000	2,84113	,677	-7,1265	4,7265	
5,00	1,00	1,20000	2,84113	,677	-4,7265	7,1265	
	2,00	,60000	2,84113	,835	-5,3265	6,5265	
	3,00	-1,40000	2,84113	,628	-7,3265	4,5265	
	4,00	1,20000	2,84113	,677	-4,7265	7,1265	

Lampiran 2.13 Hasil analisis ANOVA data kolesterol LDL dengan SPSS 15.0

**Tests of Normality**

KadarLDLkolesterol	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
	,089	25	,200(*)	,963	25	,473

\* This is a lower bound of the true significance.

a Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

KadarLDLkolesterol

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,202	4	20	,341

**ANOVA**

KadarLDLkolesterol

			Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	(Combined)		659,440	4	164,860	7,308	,001
	Linear Term	Contrast	48,020	1	48,020	2,129	,160
		Deviation	611,420	3	203,807	9,034	,001
Within Groups			451,200	20	22,560		
Total			1110,640	24			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: KadarLDLkolesterol

	(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1,00	2,00	-7,20000*	3,00400	,026	-13,4662	-,9338
		3,00	-7,60000*	3,00400	,020	-13,8662	-1,3338
		4,00	3,40000	3,00400	,271	-2,8662	9,6662
		5,00	-10,20000*	3,00400	,003	-16,4662	-3,9338
	2,00	1,00	7,20000*	3,00400	,026	,9338	13,4662
		3,00	-,40000	3,00400	,895	-6,6662	5,8662
		4,00	10,60000*	3,00400	,002	4,3338	16,8662
		5,00	-3,00000	3,00400	,330	-9,2662	3,2662
	3,00	1,00	7,60000*	3,00400	,020	1,3338	13,8662
		2,00	,40000	3,00400	,895	-5,8662	6,6662
		4,00	11,00000*	3,00400	,002	4,7338	17,2662
		5,00	-2,60000	3,00400	,397	-8,8662	3,6662
	4,00	1,00	-3,40000	3,00400	,271	-9,6662	2,8662
		2,00	-10,60000*	3,00400	,002	-16,8662	-4,3338
		3,00	-11,00000*	3,00400	,002	-17,2662	-4,7338
		5,00	-13,60000*	3,00400	,000	-19,8662	-7,3338
	5,00	1,00	10,20000*	3,00400	,003	3,9338	16,4662
		2,00	3,00000	3,00400	,330	-3,2662	9,2662
		3,00	2,60000	3,00400	,397	-3,6662	8,8662
		4,00	13,60000*	3,00400	,000	7,3338	19,8662

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## DISKUSI PARIPURNA

Indonesia sebagai negara yang sangat kaya keanekaragaman hayatinya baik tumbuhan, binatang dan mikroorganisme, belum secara maksimal memanfaatkan potensi tersebut. Departemen Biologi, FMIPA UI, memiliki koleksi biakan mikroorganisme indigenous, yang belum banyak dimanfaatkan untuk kepentingan manusia dalam bidang pertanian, kesehatan, pangan dan pakan. Salah satu koleksi biakan UICC yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelompok kapang *Aspergillus* spp.

Penelitian metabolit sekunder yang dihasilkan oleh *Aspergillus* spp. dalam menghasilkan lovastatin telah banyak dilakukan. Lovastatin berfungsi dalam pengobatan penyakit hiperkolesteromia dengan cara menghambat kerja hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-KoA) reduktase. Enzim tersebut adalah enzim yang berperan dalam sintesis kolesterol yang berlangsung dalam organ hati, sehingga senyawa tersebut dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah (Alberts *et al.* 1980).

Skrining 40 *Aspergillus* spp. koleksi *University of Indonesia Culture Collection* terhadap *C. albicans* UICC Y-29, menggunakan metode paper disk menghasilkan sepuluh *Aspergillus* spp. potensial dalam menghasilkan lovastatin. Ekstrak etil-asetat lovastatin pada pengujian tersebut dalam bentuk asam- $\beta$ -hidroksi, bersifat antifungi. Pengamatan dilakukan dengan mengukur zona bening yang dihasilkan terhadap khamir yang diujikan. Semakin besar zona bening yang dihasilkan berkorelasi dengan besarnya produksi lovastatin. Zona bening dihasilkan disebabkan karena ekstrak lovastatin yang dimasukkan dalam paper disk (40  $\mu$ L/paper disk) berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan sel khamir.

Sebanyak 18 (45%) biakan *Aspergillus* spp. menunjukkan adanya zona bening disekitar paper disk dengan ukuran zona bening berkisar antara 1,23 – 5,2 mm, antara lain: *Asp. terreus*, *Aspergillus* sp. UICC 317, *Asp. fumigatus* UICC 358, *Asp. flavus* UICC 359 dan *Asp. flavus* UICC 360. Sebanyak 22 (55%) biakan lainnya tidak menunjukkan adanya zona bening antara lain: *Asp. ochraceus*, *Asp. niger* UICC 371, *Asp. niger* UICC 77, *Asp. tubingensis* dll.



Sepuluh biakan terpilih yang menghasilkan zona bening lebih besar dari 3 mm, juga mempunyai kecepatan pertumbuhan hampir sama antara biakan satu dengan lainnya. *Aspergillus* sp. UICC 317 (5,18 mm), *Aspergillus* sp. Awy V.1 (4,89 mm), *Asp. flavus* UICC 360 (4,87 mm) menghasilkan zona bening paling besar dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans* Y-29.

Fermentasi menggunakan medium CDB. Hasil fermentasi produksi lovastatin diekstraksi menggunakan etil-asetat, menghasilkan ekstrak lovastatin antara 9,9 – 85,8 mg/L, paling besar dihasilkan oleh *Asp. flavus* UICC 360 sedangkan paling kecil adalah *Asp. awamori* UICC 31. Penelitian Miyake *et al.* (2006) menunjukkan bahwa lovastatin tertinggi dihasilkan oleh mutan *Monascus pilosus* pada sumber karbon glukosa-gliserol pepton medium (725 mg/l),

Hasil TLC dilihat pada  $\lambda$  282 nm. Kandungan lovastatin dilihat berdasarkan perbedaan migrasi eluen diklorometan : etil-asetat dengan perbandingan 7 : 3 (v/v). Nilai Rf sampel berkisar antara 0,23 – 0,27 sedangkan Rf standar lovastatin adalah 0,24. Sampel yang memiliki nilai Rf tertinggi (0,27) adalah yaitu *Asp. terreus* UICC 370 dan nilai Rf terendah (0,23) adalah *Asp. awamori* UICC 31, *Aspergillus* sp. Shi 18.1 dan *Aspergillus* sp. Shi 3.2. Sampel yang memiliki nilai Rf sama dengan standart lovastatin (0,24) adalah sampel *Aspergillus* sp. Shi 2.2, *Asp. flavus* UICC 360 dan *Asp. flavus* UICC 359. Hal ini menunjukkan ketiga sampel positif mengandung lovastatin melalui analisis kualitatif dengan TLC.

Penelitian penggunaan TLC untuk melakukan skrining terhadap produksi lovastatin juga dilakukan pada genus *Pleurotus* terutama *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus saca* dan *Pleurotus sapidus* (Cimerman *et al.* 2006). Lee *et al.* (2006) melaporkan bahwa untuk mendeterminasi adanya lovastatin pada *Pleurotus ostracesus*, dengan menggunakan TLC dari ekstrak badan buah dan miselium menunjukkan nilai Rf yang sama dengan standart yaitu 0,46. Samiee *et al.* (2003) juga menggunakan TLC dan HPLC untuk melakukan uji produksi lovastatin sebanyak 110 isolat kapang, dengan menggunakan eluen diklorometan: etil-asetat (70:30).

Gambar 3-dimensi dari lovastatin yang dihasilkan oleh sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih, dianalisis menggunakan TLC Scanner CAMAG 3

menunjukkan tinggi puncak kurva standart lovastatin (216,86), sampel terendah pada *Aspergillus* sp. Shi 18.1 tinggi puncak (117,04) dan puncak tertinggi pada *Aspergillus* sp. UICC 317 (231,26). Luas area pada hasil *TLC scanner* menunjukkan besarnya bercak-bercak yang terdapat di dalam lempeng silika.

Analisis kadar kolesterol total, trigliserida, HDL, dan LDL dalam darah tikus pertama kali adalah setelah proses aklimatisasi selama 14 hari, digunakan sebagai data awal. Selanjutnya analisis kadar kolesterol total, trigliserida, kolesterol HDL dan kolesterol LDL yang kedua yaitu setelah tikus-tikus tersebut menderita hiperkolesterolemia sebagai data kedua.

Berdasarkan hasil analisis data pertama dan kedua diperoleh data bahwa kolesterol total mengalami kenaikan menjadi 77,44 mg/dL dari awal 62,04 mg/dL, trigliserida juga meningkat dari 48 ml/dL menjadi 79,36 ml/dL, kolesterol HDL mengalami penurunan dari 33,8 ml/dL menjadi 32,8 ml/dL, sedangkan kolesterol LDL naik menjadi 28,16 mg/dL dari awal 19,64 mg/dL. Minyak kelapa yang diberikan pada tikus mengandung asam lemak jenuh 82,2 g, sedangkan kandungan minyak tidak jenuhnya berupa asam oleat 9,9 g dan linoleat 3.2 g pada tiap 100 ml (Bagian GIZI RSCM dan Persatuan Gizi Indonesia. 1999).

Hasil analisis data kolesterol total dalam darah tikus setelah pemberian bahan uji berupa ekstrak lovastatin hasil fermentasi *Asp. flavus* UICC 360 terlihat dapat menurunkan kadar kolesterol total dalam darah tikus. Rata-rata penurunan kadar kolesterol total dalam darah tikus untuk kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) sebesar 37,19%, untuk kelompok perlakuan B (dosis 0,2 mg/hari) penurunan kadar kolesterol total sebesar 40,68% dan untuk kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/hari) sebesar 41,78% masih dibawah kelompok perlakuan E (kontrol positif) sebesar 42,95%. Kelompok perlakuan D (kontrol negatif) juga memperlihatkan penurunan sebesar 32,99%, Penurunan ini disebabkan karena tubuh memiliki mekanisme homeostasis (autoregulasi) untuk mempertahankan kadar kolesterol supaya tetap secara normal, sebanyak 80% kolesterol tubuh disintesis dalam tubuh dalam hati (Marthin *et al.* 1983). Tanzawa *et al.* (1982) melaporkan pemberian statin pada tikus sebanyak 10 mg/kg berat badan diberikan secara oral akan menurunkan kadar kolesterol total sebesar 22,4%, dibandingkan kontrol yang kadar kolesterolnya dinaikkan dengan Triton WR-

1339. Zulfiana (2003) menyatakan penurunan kolesterol pada darah tikus yang diberikan filtrat hasil fermentasi lebih baik dari pada biomassa *Rhizopus* sp, menurunkan kadar kolesterol darah sampai 23,49 – 38,73%.

Penurunan kadar trigliserida pada semua kelompok perlakuan. Penurunan kadar trigliserida pada kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) adalah 61,76% lebih tinggi dari penurunan kadar trigliserida pada kelompok perlakuan E (kontrol positif) yaitu 54,40%. Kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) dan B (dosis 0,2 mg/hari) juga menunjukkan penurunan kadar trigliserida meskipun masih dibawah kelompok kontrol positif.

Hasil analisis kadar kolesterol HDL setelah pemberian ekstrak lovastatin pada kelompok A (dosis 0,1 mg/hari) terjadi peningkatan rata-rata kadar kolesterol HDL sebesar 0,4 mg/dL, sedangkan untuk kelompok B (dosis 0,2 mg/hari) dan C (dosis 0,4 mg/hari) berturut-turut terjadi rata-rata peningkatan kolesterol HDL sebesar 1 mg/dL dan 3 mg/dL, dari tiga dosis tersebut yang paling banyak meningkatkan kolesterol HDL adalah kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/hari) lebih tinggi dari rata-rata peningkatan kadar kolesterol HDL oleh kelompok perlakuan E (kontrol positif).

Hasil analisis kadar LDL setelah pemberian ekstrak lovastatin pada kelompok perlakuan A (dosis 0,1 mg/hari) terjadi penurunan rata-rata kadar kolesterol LDL terkecil yaitu 63,20%. Sedangkan penurunan rata-rata kadar LDL terbesar terjadi pada kelompok perlakuan C (dosis 0,4 mg/dL) lebih besar dari penurunan rata-rata LDL kolesterol pada kelompok kontrol positif yaitu 90%. Kolesterol LDL dibentuk dari LVDL dan kilomikron. Pada tikus yang dibuat hiperkolesterolemia terjadi kerusakan pada tempat-tempat pengikat spesifik untuk LDL (Mayes, 1983). Ganong (1995) melaporkan bahwa adanya hormon tiroid dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara peningkatan pembentukan reseptor *low density lipoprotein* (LDL).

## RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

### KESIMPULAN

Hasil skrining lovastatin sebanyak 40 isolat *Aspergillus* spp. koleksi UICC dengan metode difusi agar dihasilkan sebanyak 18 (45%) isolat positif dan 22 (55%) negatif. *Asp. flavus* UICC 360 menghasilkan lovastatin tertinggi dibandingkan sepuluh *Aspergillus* spp. terpilih .

Analisis *Thin Layer Chromatography* (TLC) menunjukkan nilai Rf sepuluh *Aspergillus* spp. (0,23 – 0,27) dan standart (0,24). Analisis *High Performance Chromatography* (HPLC) menunjukkan lovastatin *Asp. flavus* UICC 360 mempunyai waktu retensi (13,2 menit) sama dengan standart (13,2 menit).

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak lovastatin *Asp. flavus* UICC 360, yang dicekockkan pada tikus putih (*Rattus norvegicus* L. galur Sprague Dawley, pada dosis 0,1; 0,2 dan 0,4 mg/hari tidak menurunkan kadar kolesterol total serta tidak meningkatkan HDL, pada dosis 0,2 mg/hari menurunkan trigliserida sampai (61,76%), pada dosis 0,4 mg/hari dapat menurunkan kadar LDL (90%)

### SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai medium yang paling baik untuk produksi lovastatin secara maksimal.
2. Mengingat dalam hasil analisis HPLC ditemukannya puncak lain selain puncak lovastatin maka perlu dilakukan analisis lebih lanjut mengenai adanya senyawa lain dalam ekstrak selain senyawa lovastatin.
3. Perlu dilakukan variasi dosis lovastatin untuk mengetahui dosis yang paling tepat.
4. Perlu dilakukan pengamatan perubahan histologis pada jaringan hati dan ginjal dari hewan uji yang diberi lovasstatin.

## DAFTAR ACUAN

- Alberts, A.W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff & C. Hoffman. 1980. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. **77** (7): 3957-3961.
- Bagian Gizi RSCM dan Persatuan Ahli Gizi Indonesia. 1999. Penuntun Diet. P.T. Gramedia, Pustaka Utama.
- Cimerman, N.G., J. Friedrich, A. Cimerman & N. Benicki. 2006. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by fungi of the genus *Pleurotus*. *The Federation of European Materials Societies Microbiology Letters* **11** (2-3): 203-206.
- Ganong, W.F. 1995. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi ke 17. Penerjemah. Widjajakusumah. M. Dj. EGC.Jakarta.
- Lee, J.W., S.M. Lee, K.S. Gwak, J.Y. Lee & I.G. Choi. 2006. Screening of edible mushrooms for the production of lovastatin and its HMG-CoA reductase inhibitory activity. *The Korean Journal of Microbiology*. **42** (2): 83-88.
- Martin Jr., D.W., Mayes, P.A. & V.W. Rodwell. 1983. *Biokimia (Review of Biochemistry)* .Ed. 19. Alih bahasa: Dharma, A. dan A.S.Kurniawan. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. xii+686.
- Mayes, P.A. 1983. Metabolisme Lipid II Peranan Jaringan. *Dalam: Martin Jr., D.W., Mayes, P.A. & V.W. Rodwell. 1983. Biokimia (Review of Biochemistry)* .Ed. 19. Alih bahasa: Dharma, A. dan A.S.Kurniawan. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. xii+686.
- Miyake T, K. Uchitomi, M.Y. Zhang, I. Kono, N. Nozaki, H. Sammoto & K. Inagaki . 2006. Effects of the principal nutrients on lovastatin production by *Monascus pilosus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **70** (5):1154-1159.

- Samiee, S.M., N. Moazami & S. Haghghi. 2003. Screening of lovastatin production by filamentous fungi. *Iranian Biomedical Journal* 7 (1): 29-33.
- Tanzawa, K., S. Iwado & Y. Tsujita. 1982. Preparation of monacolin K. US Patent. 4.223,648.
- Zulfiana, D. 2003. *Tepung tempe sebagai substrat alternatif untuk memproduksi statin dalam menurunkan kolesterol darah tikus*. Tesis Magister Sains. Program Studi Biologi. Program Pasca Sarjana, Universitas Indonesia, Depok, xi-66.

