

AKTIVITAS FRAKSI EKSTRAK ETANOL DAUN MURBEI TERHADAP PROFIL LIPID DARAH DAN ATEROSKLEROSIS TIKUS YANG HIPERLIPIDEMIA

Eleonora Maryeta Toyo¹, Rina Herowati², Arief Nurrochmad³

¹Program Studi Farmasi, Akademi Farmasi Nusaputera Semarang

^{2,3}Program Studi S2 Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi

Email : eleonorareth@gmail.com

ABSTRAK

Daun murbei merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan sebagai antidiabetes dan antihiperlipidemia. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ketiga fraksi etanol daun murbei (n-heksana, etil asetat, dan air) sebagai antihiperlipidemi dan anti aterosklerosis berupa penurunan ketebalan dinding aorta pada tikus putih jantan galur wistar yang diberi diet tinggi lemak dan PTU.

Penelitian ini menggunakan 40 ekor tikus, yang terdiri dari satu kelompok diberi diet normal dan tujuh kelompok diberi diet tinggi lemak dan PTU selama satu bulan. Terapi perlakuan diberikan selama 14 hari. Kelompok I sebagai kontrol normal diberi Confeed PAR-S, kelompok II sebagai kontrol negatif diberi HFD dan CMC Na 0,5%, kelompok III sebagai kontrol positif diberi HFD dan simvastatin 0,9 mg/kg BB, kelompok IV sebagai kontrol positif diberi HFD dan gemfibrosil 0,9 mg/kg BB, kelompok V diberi HFD dan ekstrak etanol daun murbei dengan dosis 500 mg/kg BB, kelompok VI diberi HFD dan fraksi n-heksana dosis 60 mg/kg BB, kelompok VII diberi HFD dan fraksi etil asetat dosis 40 mg/kg BB, dan kelompok VIII diberi HFD dan fraksi air dosis 400 mg/kg BB. Semua tikus diukur profil lipid darah pada hari ke 0, 28, 35, dan 42. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki efek sebagai antihiperlipidemia dan anti aterosklerosis berupa penurunan ketebalan dinding aorta abdominalis pada tikus hiperlipidemia.

Kata kunci : daun murbei, profil lipid, antiaterosklerosis, high fat diet

PENDAHULUAN

Kolesterol adalah satu fraksi lipid dalam tubuh yang digunakan oleh banyak organisme sebagai unsur struktural dalam membran dan bahan baku untuk mensintesis garam empedu serta hormon-hormon steroid seperti aldosteron, estrogen, testosterone dan vitamin D. Kolesterol yang disintesis dalam tubuh berasal dari asetil-KoA dan membentuk asam mevalonat melalui sebuah jalur yang kompleks (Murray, 2008). Sutejo (2006) mengemukakan bahwa sebagian besar kolesterol disintesis oleh hati dan sebagian kecil diserap dari diet. Keberadaan kolesterol di dalam pembuluh darah dalam jumlah yang tinggi akan mengakibatkan endapan atau lempengan yang akan

mempersempit atau menyumbat pembuluh darah. Hal ini sering disebut sebagai aterosklerosis.

Berbagai keadaan yang berkaitan dengan aterosklerosis antara lain, faktor genetik, penyakit jantung koroner (PJK), stroke, penyakit pembuluh darah perifer, usia, jenis kelamin pria, kebiasaan merokok, hiperlipidemia, hipertensi, obesitas, diabetes melitus, kurang aktivitas fisik dan *menopause*. Secara epidemiologi pada penelitian-penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa, saat peningkatan LDL (*Low Density lipoprotein*), trigliserida, kolesterol total dan penurunan HDL (*High Density Lipoprotein*), akan berpengaruh pada pembentukan plak atau lesi aterosklerosis (Brown, 2006).

Secara medis obat-obat yang dapat menurunkan konsentrasi lipoprotein dan yang beredar di Indonesia saat ini, terdiri atas penghambat HMG KoA reduktase, niacin (asam nikotinat), asam fibrat, dan resin. Contoh obat golongan statin yaitu simvastatin, di mana obat ini dapat digunakan untuk mengurangi resiko terjadinya penyumbatan pembuluh darah arteri karena penumpukan kolesterol dalam dinding arteri darah (Nicholls *et al.*, 2010). Gemfibrosil merupakan obat golongan asam fibrat mampu meningkatkan sekresi kolesterol menuju empedu dan meningkatkan afinitas reseptor LDL untuk mengikat partikel LDL, mengaktifkan lipoprotein lipase, menghambat sintesis trigliserida, serta menekan pelepasan asam lemak bebas dari jaringan adipose (Anderson *et al.*, 2002).

Hasil penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Valacchi *et al.* (2013) menyatakan bahwa kombinasi ekstrak daun dan buah murbei dosis 500 mg/kg BB tikus dapat mempengaruhi transport kolesterol dalam hati dan jaringan kulit pada tikus obesitas yang diinduksi diet tinggi lemak. Toyo (2015) mengemukakan bahwa aktivitas ekstrak etanol daun murbei dapat meningkatkan kadar HDL dan mampu menghambat pembentukan sel busa pada dinding aorta tikus putih jantan galur wistar (*Rattus norvegicus*) yang diberi diet aterogenik. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah setengah dosis utama pada penelitian Valacchi yaitu 250 mg/kg BB tikus, karena penelitian tersebut hanya menggunakan simplisia daun murbei, sehingga dosis yang paling efektif dalam meningkatkan kadar HDL adalah dosis 100 mg/200 g BB, sedangkan dosis efektif yang digunakan untuk menghambat pembentukan sel busa adalah dosis 25 mg/100 g BB, 50 mg/200 g BB, 100 mg/200 g BB. Penelitian yang dilakukan oleh Huda (2015) juga melaporkan bahwa ekstrak etanol daun murbei mampu menurunkan kadar LDL dan dapat digunakan sebagai

anti aterosklerosis pada tikus yang diberi diet aterogenik.

Peneliti ingin melanjutkan penelitian dengan metode yang berbeda, di mana akan diuji fraksi ekstrak etanol daun murbei terhadap HDL dan LDL menggunakan metode CHOD-PAP serta anti aterosklerosis berupa penurunan ketebalan dinding aorta abdominalis tikus yang diproses dan diberi pewarnaan hematoksilin eosin (HE). Pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi adalah n-heksana, etil asetat, dan air, sehingga diharapkan dapat terjadi pemisahan senyawa nonpolar, semi polar, dan polar yang terkandung dalam ekstrak etanol daun murbei.

Peneliti juga memilih penghambatan pembentukan aterosklerosis sebagai parameter, karena saat terjadi peningkatan LDL akibat pemberian diet tinggi lemak dan PTU (propil tiourasil) selama 4 minggu atau 28 hari diharapkan dapat terbentuk aterosklerosis pada dinding pembuluh darah tikus. Pembentukan aterosklerosis terjadi karena kerusakan endotel akibat adanya respon inflamasi pada LDL oksidasi dan merangsang peningkatan monosit yang akan menempel pada endotel sehingga berubah menjadi makrofag. Makrofag berfungsi menelan dan membersihkan lemak LDL yang teroksidasi melalui reseptor *scavenger*. Sel *scavenger* ini kemudian menjadi sel busa dan selanjutnya membentuk lapisan kerak lemak sehingga terbentuk aterosklerosis (Fathoni, 2011).

METODE PENELITIAN

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Murbei

Ekstrak etanolik dibuat dengan cara diambil 2000 g serbuk daun murbei kemudian di masukkan dalam wadah berwarna gelap lalu ditambah etanol 70% dengan perbandingan 1 : 10 selanjutnya rendam selama 6 jam pertama sambil

sesekali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Pisahkan maserat dengan cara disaring dan filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dengan *vacuum rotary evaporator* (suhu dijaga pada 50°C) sampai diperoleh ekstrak kental.

Fraksinasi Ekstrak Daun Murbei

Ekstrak etanol daun murbei sebanyak 10 gram dilarutkan sedikit dengan air panas, kemudian dipartisi dengan air 50 ml dan pelarut n-heksana 50 ml ke dalam corong pisah diulang sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksana merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak dibawah. Fraksi n-heksana dipisahkan dari fraksi air ditampung dan dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50°C.

Fraksi air sisa dari fraksi n-heksana kemudian difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 50 ml menggunakan corong pisah proses ini diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air terletak dibawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipisahkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu penangas 50°C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangas air sampai kental.

Penyiapan Hewan Percobaan

Hewan percobaan yang digunakan adalah 40 ekor tikus putih jantan galur wistar dengan kisaran bobot 180-250 g, berumur 2-3 bulan. Sebelum perlakuan, tikus diadaptasikan selama 7 hari dengan diberikan makanan berupa pelet dan air. Langkah selanjutnya yaitu pengukuran profil lipid darah awal sebagai H₀,

kemudian diberi diet tinggi lemak dan PTU 0,01% pada semua kelompok uji, kecuali pada Kelompok I yang hanya diberikan pakan biasa dan air. Selain kelompok I, diberi diet tinggi lemak selama 28 hari. Tikus dibuat hiperlipidemia dengan cara pemberian pakan yang mengandung Confeed PAR-S 200 g, terigu 100 g, kolesterol 8 g, asam kolat 0,8 g, minyak babi 40 ml, dan air 51,2 ml. Semua bahan diaduk sampai homogen, kemudian dibuat pelet dan dikeringkan. Demikian pula pemberian PTU 0,01% secara per oral. Tikus perlakuan dibagi menjadi 8 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 ekor tikus sebagai berikut : Kelompok I, yaitu kelompok kontrol normal (K1), Kelompok II, yaitu kelompok negatif (K2), Kelompok III, yaitu kelompok kontrol positif yang diberikan simvastatin 0,9 mg/kg (K3), Kelompok IV, yaitu kelompok kontrol positif yang diberikan gemfibrosil 0,9 mg/kg (K4), Kelompok V, yaitu kelompok ekstrak etanol daun murbei 500 mg/kg (K5), Kelompok VI, yaitu kelompok fraksi n-heksana 60 mg/kg (K6), Kelompok VII, yaitu kelompok fraksi etil asetat 40 mg/kg (K7), dan kelompok VIII yaitu kelompok fraksi air 400 mg/kg (K8). Semua perlakuan di atas, diberikan secara oral.

Pengukuran profil lipid berikut, pada hari ke-28 bertujuan untuk melihat seberapa besar peningkatan kadar LDL dan penurunan HDL pada serum darah tikus. Pemberian dosis pada semua kelompok uji dilakukan setelah pengukuran profil lipid pada hari yang sama. Selanjutnya pengukuran profil lipid darah dilakukan pada hari ke-35 dan hari ke-42. Langkah terakhir adalah pembedahan atau analisis preparat histopatologi aorta abdominalis tikus dengan pewarnaan hematoksilin eosin (HE).

Penentuan kadar HDL dan LDL menggunakan metode CHOD-PAP, di mana serum darah tikus diambil melalui melalui vena mata (*retroorbitalis plexus*) dengan mikrohematokrit sebanyak 0,5 ml

lalu disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 3000 mikro pereaksi kolesterol dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 20-25°C, kemudian serapannya diamati menggunakan alat fotometer Stardust. Absorpsi yang terbaca, dicatat untuk menetapkan kadar profil lipid (mg/dL).

Pengukuran Parameter Lipid

Pengukuran HDL dan LDL pada serum ditentukan dengan metode kolorimetrik enzimatis menggunakan alat Humalyzer Junior. Pengukuran lipid dilakukan menggunakan rumus Indeks aterogenik (AI) dan indeks resiko koroner (CRI). Aterogenik dihitung dengan rumus dari Abbot *et al.*, (1988) dan resiko koroner diperoleh dengan metode Alladi *et al.*, (1989). Untuk data kolesterol total diperoleh secara paralel.

Rumus :

$$\text{Indeks aterogenik (AI)} = \frac{\text{LDL}}{\text{HDL}}$$

Indeks Resiko

$$\text{Koroner (CRI)} = \frac{\text{Kolesterol total}}{\text{HDL}}$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik yang digunakan untuk uji terdistribusi normal dengan metode *Kolmogorov-Smirnov*. Jika data terdistribusi normal ($p > 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji parametrik varian dua arah (ANOVA). Uji dilanjutkan dengan Post Hoc untuk melihat apakah terdapat perbedaan diantara masing-masing kelompok perlakuan.

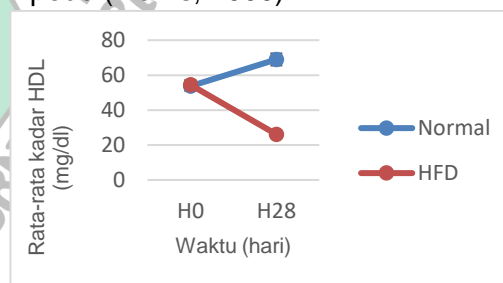
Data pengukuran ketebalan dinding aorta tikus dianalisis secara kuantitatif dengan menghitung rata-rata ketebalan aorta abdominalis, kemudian dilanjutkan analisa statistik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penetapan Kadar HDL

Pengukuran kadar HDL dilakukan empat kali, yaitu pada hari ke-0 sebagai pengambilan darah awal, pada hari ke-28 untuk mengukur kondisi hiperlipidemia hewan uji setelah pemberian diet tinggi lemak dan PTU selama 28 hari, pada hari ke-35 dan hari ke-42 untuk mengetahui pengukuran kadar HDL yang optimal setelah diberi perlakuan. Hal serupa dilakukan pada profil lipid lain yaitu kadar LDL, trigliserida, dan kolesterol total. Hasil rata-rata peningkatan kadar HDL dapat dilihat pada tabel 1.

HDL berfungsi sebagai pembawa kolesterol bebas dari jaringan perifer menuju hati. Kolesterol tersebut akan diubah menjadi kolesterol ester yang sebagian dipindahkan ke VLDL melalui bantuan enzim CETP (*choleseryl Ester Transfer Protein*) dan dikembalikan lagi ke hati oleh IDL dan LDL. Hati akan memanfaatkan kembali kolesterol ini, kemudian diubah menjadi garam empedu atau langsung diekskresikan ke dalam empedu (Marks, 2000).



Gambar 1. Grafik rata-rata kadar HDL tikus pada H₀-H₂₈ (mg/dl)

Pada gambar grafik pengukuran kadar HDL setelah induksi diet tinggi lemak atau *high fat diet* (HFD) dan PTU menunjukkan bahwa HDL kelompok normal meningkat dan kelompok HFD menurun. Hal ini disebabkan oleh lama waktu pemberian dan komposisi pakan yang diberikan ke hewan uji, menyebabkan penurunan kadar HDL. Artinya induksi HFD yang diberikan baik secara eksogen maupun secara endogen selama 28 hari

mampu menurunkan kadar HDL. Sedangkan fungsi utama HDL adalah mengangkut kelebihan kolesterol bebas dan asam lemak yang terdapat dalam jaringan endotel pada pembuluh darah. Friedwald *et al.*, (2001) mengemukakan bahwa penurunan kadar HDL disebabkan oleh tingginya kadar kolesterol dalam darah, di mana kelebihan kolesterol tersebut akan menumpuk dalam jaringan perifer, yang selanjutnya diikuti oleh aktivitas radikal bebas sehingga terjadi oksidasi pada jaringan.

Berdasarkan hasil pengukuran rata-rata kadar HDL pada tabel 1 dan didukung oleh analisa statistik pada tabel 2 menggunakan *Two Way ANOVA* kemudian dilanjutkan *Tukey Post Hoc Test* menunjukkan bahwa hasil signifikan ($p > 0,005$) berarti ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan. Hasil analisa tersebut dapat dilihat pada pengukuran kadar HDL hari ke-42 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat sebanding dengan kontrol positif simvastatin dan kontrol positif gemfibrosil, sedangkan ekstrak daun murbei sebanding dengan fraksi n-heksana dan fraksi air. Hal ini diduga adanya peranan senyawa-senyawa kimia dalam daun murbei yang dapat bekerja sebagai antihiperlipidemia, misalnya senyawa flavonoid yang dapat menurunkan kolesterol (Mills & Bone, 2000). Hal serupa dibuktikan dengan hasil analisa KLT yang telah disemprotkan pereaksi sitroborat untuk menampakkan bercak warna kuning pada sinar UV 366

nm yang menandakan adanya senyawa flavonoid pada daun murbei. Selain itu juga terdapat senyawa alkaloid dan polifenol pada daun murbei. Hal ini ditunjukkan pada warna yang terbentuk dalam mengidentifikasi senyawa alkaloid yaitu warna orange setelah disemprot pereaksi dreagendrof dan warna hitam kehijauan atau biru gelap pada identifikasi polifenol yang disemprot dengan pereaksi $FeCl_3$.

Pada percobaan *in vitro* telah menunjukkan bahwa flavonoid bekerja sebagai inhibitor enzim HMG-KoA reduktase, sehingga sintesis kolesterol menurun (Siregar, 2015). Fungsi lain dari flavonoid adalah dapat meningkatkan kadar HDL dengan cara meningkatkan produksi Apo A1, di mana Apo 1 berperan sebagai kofaktor enzim untuk LCAT dan sebagai ligan untuk berinteraksi dengan reseptor lipoprotein dalam jaringan pada HDL dan bersifat protektif terhadap aterosklerosis (Guillaume *et al.*, 2001).

Terapi farmakologi antihiperlipidemia antara lain obat-obat hipolipidemik sintetis golongan statin dan golongan fibrat. Simvastatin merupakan salah satu contoh obat golongan statin yang bekerja sebagai inhibitor enzim HMG KoA reduktase yang merupakan suatu enzim pembentuk asam mevalonat dalam tahap biosintesis kolesterol, sehingga mampu menurunkan sintesis kolesterol di hati dan secara langsung akan menurunkan kadar kolesterol darah (Taylor *et al.*, 2013).

Tabel 1. Rata-rata kadar HDL darah tikus

Kelompok	Rata-rata kadar HDL (mg/dl)			
	Waktu (hari)			
	H ₀	H ₂₈	H ₃₅	H ₄₂
Kontrol normal	53,66 ± 2,42	68,98 ± 3,61	74,30 ± 3,73 ^{bcd}	66,10 ± 1,83 ^{bcd}
Kontrol HFD	54,47 ± 1,93	26,12 ± 1,23	27,30 ± 1,51 ^{acd}	25,53 ± 2,40 ^{acd}
HFD + Kontrol (+) Simvastatin	57,89 ± 3,66	24,49 ± 1,17	36,60 ± 1,51 ^{ab}	59,59 ± 1,36 ^{ab}
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil	63,72 ± 3,06	25,57 ± 1,03	34,31 ± 1,15 ^{ab}	56,31 ± 1,91 ^{ab}
HFD + Ekstrak daun murbei	62,11 ± 3,04	23,93 ± 1,94	25,84 ± 2,34 ^{ad}	36,45 ± 3,67 ^{abcd}

HFD + Fraksi n-heksana	59,70 ± 2,89	24,35 ± 1,30	27,36 ± 1,23 ^{ad}	42,12 ± 1,70 ^{abcd}
HFD + Fraksi etil asetat	58,89 ± 6,33	24,62 ± 2,42	36,06 ± 1,97 ^{ab}	55,74 ± 2,38 ^{ab}
HFD + Fraksi air	57,08 ± 2,78	21,90 ± 1,30	27,30 ± 1,51 ^{acd}	45,95 ± 4,57 ^{abcd}

Keterangan : *Pembacaan untuk *One Way Anova*

a : berbeda signifikan terhadap kontrol normal

b : berbeda signifikan terhadap kontrol HFD

c : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Simvastatin

d : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil

Tabel 2. Hasil analisa subsets perubahan kadar HDL H₀ sampai H₄₂ pada kelompok perlakuan menggunakan *Two Way ANOVA*

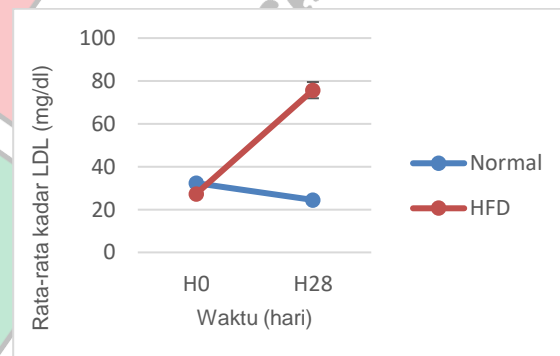
Kelompok	Subset			
	1	2	3	4
Kontrol normal				*
Kontrol HFD	*			
HFD + Kontrol (+) Simvastatin			*	
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil			*	
HFD + Ekstrak daun murbei		*		
HFD + Fraksi n-heksana		*		
HFD + Fraksi etil asetat			*	
HFD + Fraksi air		*		

Keterangan : (*) : sebanding

Hasil Penetapan Kadar LDL

Pengukuran kadar HDL, kadar LDL dan kolesterol total dilakukan dengan menggunakan metode CHOD-PAP. Serum darah tikus diambil melalui vena mata (*retroorbitalis plexus*) kemudian dilakukan sentrifugasi dan diamati hasil penetapan kadar LDL. Rata-rata pengukuran kadar LDL dapat dilihat pada tabel 3.

Confeed PARS sebagai bahan dasar untuk membuat pelet, sedangkan pemakaian kolesterol, minyak babi, dan asam kolat bertujuan untuk menginduksi peningkatan LDL darah. Minyak babi, mempunyai kandungan kolesterol yang lebih tinggi dibandingkan minyak hewani lainnya dan minyak nabati (Ameli *et al.*, 1997).



Gambar 2. Grafik rata-rata kadar LDL tikus pada H₀-H₂₈ (mg/dl)

Asam kolat ditambahkan karena dapat merubah gambaran lipoprotein menjadi lebih aterogenik, yang berarti asam kolat dapat menurunkan kadar HDL dan meningkatkan kadar LDL plasma (Srivastava *et al.*, 2000). Ganong (1995) mengemukakan bahwa PTU merupakan suatu zat antitiroid yang dapat merusak kelenjar tiroid sehingga menghambat pembentukan hormon tiroid. Hormon tiroid dapat menurunkan kadar kolesterol dalam darah dengan cara meningkatkan pembentukan LDL di hati yang mengakibatkan pengeluaran kolesterol

dari sirkulasi. Kekurangan hormon tiroid mengakibatkan katabolisme kolesterol

menurun, sehingga terjadi peningkatan kolesterol dalam darah.

Tabel 3. Rata-rata kadar LDL darah tikus

Kelompok	Rata-rata LDL (mg/dL)			
	Waktu (hari)			
	H ₀	H ₂₈	H ₃₅	H ₄₂
Kontrol normal	32,32 ± 1,29	24,50 ± 2,21	22,39 ± 2,73 ^{bcd}	22,00 ± 2,20 ^{bcd}
Kontrol HFD	27,34 ± 2,96	75,70 ± 1,05	71,07 ± 1,40 ^a	70,18 ± 1,87 ^{acd}
HFD + Kontrol (+) Simvastatin	32,72 ± 8,24	76,95 ± 1,42	64,98 ± 1,56 ^a	38,12 ± 1,39 ^{ab}
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil	32,45 ± 2,40	76,12 ± 2,19	65,37 ± 1,77 ^a	34,36 ± 2,78 ^{ab}
HFD + Ekstrak daun murbei	35,82 ± 2,05	75,15 ± 2,28	69,38 ± 1,06 ^a	59,63 ± 1,74 ^{acd}
HFD + Fraksi n-heksana	29,90 ± 1,40	77,23 ± 1,74	68,86 ± 3,16 ^a	42,16 ± 1,50 ^{abd}
HFD + Fraksi etil asetat	29,22 ± 2,16	81,10 ± 1,33	62,13 ± 2,29 ^a	34,80 ± 2,67 ^{ab}
HFD + Fraksi air	25,72 ± 2,54	84,56 ± 0,90	70,03 ± 1,67 ^a	57,76 ± 1,14 ^{acd}

Keterangan : *Pembacaan untuk *One Way Anova*
a : berbeda signifikan terhadap kontrol normal
b : berbeda signifikan terhadap kontrol HFD
c : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Simvastatin
d : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil

Tabel 4. Hasil analisa subsets perubahan kadar LDL H₀ sampai H₄₂ pada kelompok perlakuan menggunakan *Two Way ANOVA*

Kelompok	Subset			
	1	2	3	4
Kontrol normal	*			
Kontrol HFD				*
HFD + Kontrol (+) Simvastatin		*	*	
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil		*		
HFD + Ekstrak daun murbei				*
HFD + Fraksi n-heksana			*	
HFD + Fraksi etil asetat		*		
HFD + Fraksi air				*

Keterangan : (*) : sebanding

Analisa statistik pada tabel 4 dengan menggunakan *Two Way ANOVA* kemudian dilanjutkan *Tukey Post Hoc Test* menunjukkan bahwa hasil signifikan ($p > 0,005$) berarti ada perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan. Hasil analisa tersebut dapat dilihat pada pengukuran kadar LDL hari ke-42 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat sebanding dengan kontrol positif simvastatin dan kontrol positif gemfibrosil. Fraksi n-heksana sebanding dengan

kontrol positif simvastatin, sedangkan fraksi air sebanding dengan kontrol negatif dan ekstrak daun murbei. Fraksi etil asetat daun murbei mempunyai efek sebagai anti hiperlipidemia dan anti aterosklerosis tikus yang diberikan diet tinggi lemak dengan dosis efektifnya adalah 40 mg/kg BB, karena aktivitas fraksi tersebut sebanding dengan kontrol positif simvastatin dan gemfibrosil.

Murbei merupakan tanaman dari suku moraceae yang mengandung banyak

senyawa kimia seperti *ecdysteroid*, *inokosterone*, *lupeol*, β -*sitosterol*, *rutin*, *moracetin*, *scopoletin*, *benzaldehida*, *eugenol*, *linalol*, *benzyl alkohol*, *butylamine*, *aseton*, *kholine* dan *quercetin* (Kim *et al.*, 2000). Flavonoid merupakan senyawa antioksidan yang potensial dalam menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida dalam darah, serta dapat melindungi kerusakan dan mengatasi penumpukkan plak pada pembuluh darah arteri. Flavonoid dapat menurunkan peroksidasi lipid, di mana flavonoid ini bekerja sebagai inhibitor enzim HMG-KoA reductase sehingga terjadi penurunan sintesis kolesterol (Chen, 2006). Polifenol adalah kelompok antioksidan yang secara alami ada di dalam sayuran, buah-buahan, kacang-kacangan, dan minyak. Senyawa polifenol meliputi flavonol, isoflavon, flavanon, antosianidin, katekin, dan biflavan (Mokgope, 2006). Polifenol bersifat sebagai antioksidan, karena kemampuannya melawan pembentukan radikal bebas dalam tubuh (Amelia, 2014). Suryanto (2012) mengemukakan bahwa dapat menurunkan kadar kolesterol plasma darah, terutama kolesterol dalam partikel lipoprotein berdensitas rendah (LDL), dan selalu digunakan sebagai indikator untuk mendiagnosis kemungkinan adanya gangguan jantung akibat aterosklerosis.

Hasil Pengukuran Aterosklerosis

Nilai indeks aterogenik (AI) dan indeks resiko koroner (CRI) merupakan indikator untuk mengetahui resiko aterosklerosis yang merupakan faktor utama penyebab penyakit jantung koroner. Data yang digunakan untuk perhitungan indeks aterogenik adalah data kadar HDL, kadar LDL, dan kadar kolesterol total.

Perhitungan AI dan CRI terlampir dan hasil rata-rata perhitungannya dapat dilihat pada tabel 5.

Berdasarkan analisis statistik menggunakan *Two Way ANOVA*, kemudian dilanjutkan uji *Tukey Post Hoc Test* digunakan untuk melihat perbedaan masing-masing dosis uji terhadap nilai AI dan CRI. Pada tabel di atas menunjukkan bahwa dosis fraksi etil asetat sebanding dengan kontrol positif simvastatin dan kontrol positif gemfibrosil, sedangkan fraksi air sebanding dengan fraksi n-heksana. Hasil dari rata-rata pengukuran lipid dengan rumor AI dan CRI dan analisa statistik ini menyatakan bahwa fraksi etil asetat 40 mg/kg BB dianggap paling efektif sebagai antihiperlipidemia.

Indeks aterogenik (AI) merupakan salah satu faktor resiko yang sangat penting untuk mengetahui resiko aterosklerosis (Mufidah *et al.*, 2010). Semakin tinggi nilai AI maka semakin tinggi pula resiko terkena aterosklerosis dan salah satu penyebabnya adalah penurunan kadar HDL, di mana pada kadar tersebut diketahui dapat menurunkan resiko aterosklerosis melalui hipotesis mekanisme. Mekanisme tersebut antara lain ; melalui mekanisme pengangkut balik kolesterol dari jaringan ke hati dan kemampuan anti-aterogenik HDL terkait tugasnya sebagai antioksidan di saluran darah. Secara *in vitro* Apo A-I dapat melindungi LDL dari serangan oksidasi. Apo A-I merupakan protein utama penyusun HDL (Ginsberg dan Karmally, 2000). Menurut Usoro *et al.* (2006) mengemukakan bahwa semakin tinggi kadar HDL, semakin rendah nilai indeks aterogenik sehingga resiko aterosklerosis akan semakin kecil.

Tabel 5. Rata-rata perhitungan AI dan CRI

Kelompok	Indeks Aterogenik (AI)		Indeks Resiko Koroner (CRI)	
	H ₃₅	H ₄₂	H ₃₅	H ₄₂
Kontrol normal	0,29 ± 0,04 ^{bcd}	0,40 ± 0,03 ^{bcd}	1,11 ± 0,05 ^{bcd}	1,33 ± 0,05 ^{bcd}
Kontrol HFD	2,60 ± 0,18 ^{acd}	2,76 ± 0,32 ^{acd}	6,31 ± 0,20 ^{acd}	6,57 ± 0,57 ^{acd}
HFD + Kontrol (+) Simvastatin	1,87 ± 0,08 ^{ab}	0,66 ± 0,03 ^{ab}	4,56 ± 0,18 ^{ab}	1,74 ± 0,02 ^{ab}
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil	1,90 ± 0,07 ^{ab}	0,60 ± 0,06 ^{ab}	4,60 ± 0,17 ^{ab}	1,64 ± 0,12 ^{ab}
HFD + Ekstrak daun murbei	2,69 ± 0,20 ^{acd}	1,64 ± 0,18 ^{abcd}	6,63 ± 0,61 ^{acd}	3,33 ± 0,35 ^{abcd}
HFD + Fraksi n-heksana	2,52 ± 0,21 ^{acd}	0,99 ± 0,06 ^{abcd}	6,26 ± 2,54 ^{acd}	2,54 ± 0,12 ^{abcd}
HFD + Fraksi etil asetat	1,70 ± 0,11 ^{ab}	0,62 ± 0,06 ^{ab}	4,65 ± 0,22 ^{ab}	1,73 ± 1,10 ^{ab}
HFD + Fraksi air	2,56 ± 0,10 ^{acd}	1,26 ± 0,15 ^{abcd}	6,28 ± 0,37 ^{acd}	2,76 ± 0,36 ^{abcd}

Keterangan : Pembacaan untuk *Two Way Anova*

a : berbeda signifikan terhadap kontrol normal

b : berbeda signifikan terhadap kontrol HFD

c : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Simvastatin

d : berbeda signifikan terhadap HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil

Hasil Uji Histopatologi

Pada hari ke-42 setelah perlakuan, tikus diambil tiga ekor tiap kelompok uji kemudian didekapitasi serta diambil aorta abdominalis. Potongan aorta abdominalis difiksasi dengan menggunakan buffer formalin, kemudian dilakukan pemrosesan jaringan dan blok paraffin, dibuat dalam bentuk preparat, dilanjutkan prosedur pengecatan hematoksilin eosin. Pembacaan preparat ketebalan tunika intima sampai tunika adventisia pada aorta abdominalis, diperiksa menggunakan mikroskop kaca objektif perbesaran 10 x 10, kemudian pengukurannya dapat dilihat secara kualitatif dan kuantitatif dengan menggunakan *software LEICA application suite*. Sebelum pengukuran menggunakan *software* tersebut, perlu dilakukan kalibrasi, dan hasil pengamatan histopatologi aorta abdominalis tikus terlihat pada gambar 3. Hasil rata-rata ketebalan dinding aorta dapat dilihat pada tabel 6.

Gambaran histopatologi aorta tikus yang diperoleh menunjukkan bahwa pada kontrol normal, memiliki bentuk normal karena tidak ada kerusakan endotel, di mana tidak terdapat lesi di tunika intima dan perlemakan di tunika media maupun adventisia. Lapisan

endotel tersusun rapi dan halus, berbentuk pipih, dan poligonal dengan

sumbu panjang sel sejajar dengan aliran darah. Lapisan endotel tersusun rapi dan halus, serta tunika intima disusun oleh sel endothelial atau *single cell layer*, sedangkan tunika media disusun oleh sel otot polos. Pada kontrol HFD, dapat diamati adanya sel inflamasi pada lapisan tunika adventisia. Infiltrasi sel inflamasi diakibatkan karena adanya oksidasi LDL, sehingga terjadi proses inflamasi akut yang menyebabkan vasodilatasi dan monosit dalam bentuk darah akan masuk melalui celah antar endotel serta masuk pada tunika adventisia, di mana terbentuk deposisi lemak. Kerusakan ini diakibatkan oleh adanya induksi hiperkolesterolemia yang memicu radikal bebas dan terjadi reaksi inflamasi sehingga terbentuk perlemakan pada tunika adventisia. Hal serupa dilaporkan oleh Herpandi (2005) yang mengatakan bahwa kadar kolesterol yang berlebihan akan mengganggu proses metabolisme, sehingga kolesterol tersebut menumpuk di hati. Kolesterol yang masuk ke hati tidak dapat diangkut seluruhnya oleh lipoprotein menuju hati. Keadaan tersebut membuat kadar kolesterol total dan kadar LDL meningkat, sehingga memicu radikal bebas dan menyebabkan proses inflamasi pada tunika adventisia.

Tabel 6. Perhitungan rata-rata ketebalan dinding aorta

Kelompok	Ketebalan dinding aorta			
	Hewan			
	1	2	3	Rata-rata
Kontrol normal	138,13 ± 52,89	190,88 ± 37,06	225,95 ± 37,75	185,00 ± 53,52
Kontrol HFD	231,06 ± 97,33	230,44 ± 46,40	220,23 ± 39,02	227,24 ± 57,57
HFD + Kontrol (+) Simvastatin	242,10 ± 35,59	307,75 ± 22,41	337,28 ± 93,96	295,71 ± 66,55
HFD + Kontrol (+) Gemfibrosil	239,24 ± 72,24	238,85 ± 57,96	223,94 ± 26,52	234,01 ± 224,54
HFD + Ekstrak daun murbei	238,16 ± 66,64	204,52 ± 40,80	230,94 ± 48,16	224,54 ± 48,39
HFD + Fraksi n-heksana	197,97 ± 43,92	196,82 ± 15,13	230,31 ± 34,19	208,37 ± 33,21
HFD + Fraksi etil asetat	327,73 ± 88,05	203,44 ± 8,21	164,61 ± 16,99	290,70 ± 124,66
HFD + Fraksi air	223,50 ± 52,11	433 ± 107,65	215,61 ± 55,77	237,19 ± 75,69

Menurut Beers (2003) mengatakan bahwa reaksi inflamasi direspon tubuh dengan mengeluarkan sel-sel inflamasi berupa makrofag, neutrofil, dan limfosit, di mana makrofag merupakan penanda aling jelas dari terjadinya hiperlipidemia. Sel inflamasi yang terlebih dahulu muncul yaitu neutrofil, karena inflamasi yang terjadi adalah inflamasi akut (Butterfield *et al.*, 2006). Neutrofil menghambat adanya infeksi dengan melepaskan prostaglandin menyebabkan peningkatan vasodilatasi dan permeabilitas vaskular (Nair, 2004). Permeabilitas vaskular akibat prostaglandin menyebabkan deposisi lemak yang ada pada endotel masuk melalui celah endotel ke dalam tunika adventisia.

Terapi ekstrak dan fraksi daun murbei dapat meningkatkan sekresi asam empedu yang akan meningkatkan metabolisme lemak, sehingga kelebihan lemak tersebut akan dikeluarkan melalui usus besar dalam bentuk feses. Lemak yang dibuang akan menurunkan kadar kolesterol darah, terutama kadar LDL yang berlebihan. Kandungan senyawa dalam ekstrak dan fraksi daun murbei, diantaranya adalah antioksidan berupa kuersetin yang dapat bekerja sebagai antihiperlipidemia, di mana dapat meningkatkan kadar HDL dan menurunkan kadar LDL, trigliserida serta kolesterol total. Brown (2003) melaporkan bahwa antioksidan akan meningkatkan kadar HDL

dengan cara meningkatkan mRNA Apo A1 hati yang berperan untuk menginisiasi sintesis Apo A1, di mana Apo A1 ini merupakan komponen utama HDL. Apo A1 dapat menekan kelebihan LDL sehingga tidak terjadi LDL oksidasi. Anti inflamasi akan mengurangi efek inflamasi dari proses oksidasi LDL yang dapat mengurangi infiltrasi sel inflamasi dalam tunika adventisia aorta.

Terapi ekstrak dan fraksi daun murbei menunjukkan adanya perbaikan sel endotel dengan lapisan endotel yang mulai tersusun rapi berbentuk pipih, namun masih terlihat sel endotel yang kasar dengan bentuk tidak beraturan, sedangkan pada pemberian obat sintetik simvastatin dan gemfibrosil menunjukkan perbaikan sel endotel yang tersusun rapi, halus dan berbentuk pipih mendekati kontrol normal. Artinya kandungan senyawa yang terdapat dalam daun murbei memiliki aktivitas sebagai anti hiperlipidemia dan anti aterosklerosis pada tikus yang diinduksi diet tinggi lemak dan PTU.

Menurut Katsube *et al.*, 2006 ; Enkhmaa *et al.*, 2005 melaporkan bahwa daun murbei memiliki kandungan senyawa flavonoid yaitu quercetin 3-(6-malonylglucoside) yang berperan sebagai penghambat modifikasi atau akumulasi LDL-oks. Selain itu, oleh Harauma *et al.*, 2007 menyatakan bahwa pemberian bubuk daun murbei dapat mempengaruhi ukuran lesi aterosklerotik aorta tikus hingga

pengurangannya menjadi 40%. Naderi *et al.*, 2003 juga menyatakan bahwa antosianin dan kuersetin mempunyai aktivitas sebagai antioksidan yang kuat. Kursetin dan derivatnya dari kelompok flavonoid dapat menghambat pembentukan kadar LDL manusia secara *in vitro*. Ada pun penelitian yang dilakukan oleh Singab (2006) mengungkapkan bahwa ekstrak kulit kayu tanaman murbei yang diberikan secara oral dapat mengatasi aterosklerosis, LDL-oks, agregasi LDL dan retensi LDL. Menurut Asmariyani dan Probosari (2012) menjelaskan bahwa flavonoid kuersetin berperan sebagai antioksidan dalam menekan terjadinya oksidasi LDL sebagai hasil reaksi inflamasi, di mana senyawa tersebut menghambat pelepasan radikal O₂ yang reaktif sehingga tidak terjadi kerusakan endotel dengan menghambat inisiasi dari reaksi oksidasi. Antioksidan juga mengurangi tonsisitas LDL yang teroksidasi terhadap sel endotel dan mengurangi degradasi oksidatif akibat nitrit oksida.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah pemberian fraksi etil asetat daun murbei (*Morus australis* Poir.) dapat mempengaruhi profil lipid sebagai anti hiperlipidemia. Selain itu, dengan pemberian ketiga fraksi ekstrak etanol daun murbei (n-heksana, etil asetat, dan air) mampu mengatasi aterosklerosis berupa penurunan ketebalan dinding aorta abdominalis pada tikus yang diberi diet tinggi lemak dan PTU.

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, ucapan terima kasih disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat peneliti sebutkan namanya satu per satu, yang telah memberikan dukungan dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbott RD, Wilson PW, Kannel WB, Castelli WP. 1988. High density lipoprotein-cholesterol, total cholesterol screening and myocardial infarction. *The Framingham Study. Arteriosclerosis*, 8 : 207-211. PMID : 3370018.
- Alladi S., Shanmugasundaram KR. 1989. Induction of hypercholesterolemia by supplementing soy protein with acetate generating amino acids. *Nutrition Reports International*, 40(5) : 893-899. ISSN:0029-6635
- Amelia. 2014. *Fitokimia Komponen Ajaib Cegah PJK, DM dan Kanker*. Bogor. Lembaga ilmu pengetahuan Indonesia.
- Asmariyani WG., E. Probosari. 2012. Pengaruh pemberian buah papaya (*Carisa papaya* L.) terhadap kadar kolesterol LDL dan kolesterol HDL pada tikus *Sprague Dawley* dengan hiperkolesterolemia. *Journal of Nutrition College*. 1(1) : 256-268.
- Anderson, P.O., Knoblen, J.E., dan Troutman, W.G., 2002, *Handbook of Clinical Drug Data, 10th Edition*, Mc Graw Hill, New York
- Beers. M.H., A.J Fletcher, T.V Jones. 2003. *Aneurysms and Aortic Dissection*. The Merck Manual of Medical Information, 2nd ed. USA, Merck & Co., Inc. 204-208.
- Brown, BG., EJ Schaefer, D Albers. 2006. *Simvastatin and niacin, antioxidant vitamins or the combination for the prevention of coronary disease*. English Journal Medicine 345. 1583-1592.
- Butterfield, TA., TM. Best and MA. Merrick. 2006. *The Dual Roles of Neutrophils and Macrophages in Inflammation : A Critical Balance Between Tissue Damage and Repair*. Journal of Athetic Training 41(4): 457-465.
- Chen, P.N., 2006, Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect

- on the migration and invasion of a human lung cancer cell line, *Cancer Letter*, **235**(2):248-259.
- Enkhmaa, B., Shiwaku, K., Katsube, T., Kitajima, K., Anuurad, E., Yamasaki, M., et al. (2005). Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion
- Fathoni M, 2011. *Penyakit Jantung Koroner: Patofisiologi, Disfungsi Endotel, dan Manifestasi Klinis*. edisi ke-1. Surakarta: UNS Press.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 2001 Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.
- Ganong, W.F. 1995. *Fisiologi Kedokteran*. Edisi Ke-17. Penerjemah: Widjajakusuma, M.Dj. Jakarta: EGC.
- Ginsberg HN, Goldberg IJ. 2000. *Disorder of Intermediary Metabolism*. New York: McGraw-Hill Health Professions Div.
- Guillaume R, Sonia P, Patrick C, Simone L, Benoit L, Charles C. 2006. Favourable Impact of Low Calori Cranberry Juice Consumption on Plasma HDL-cholesterol Concentrations in Men. *British Journal of Nutrition*. Vol. 96.
- Huda, N. 2015. Aktivitas Penurunan Kadar LDL dan Anti Aterosklerosis Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus australis* Poir.) Tikus yang diberi Diet Aterogenik [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Katsube., Takuya., Imawaka., Naoto., Kawano., Yasuhiro., Yamazaki., Yoshimitshu., Shiwaku, Kuninori., and Yamane., Yosuke. 2006. Antioxidant Flavonol Glycosides Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves Isolated based on LDL Antioxidant Activity. *Food Chemistry*. 97. pp.25–31.
- Kim S. Y., Gao J. J., Kang H. K., 2000, Two flavonoids from the leaves of *Morus alba* induce differentiation of the human promyelocytic leukemia (HL-60) cell line, *Biol Pharm Bull*. 23(4):451-5
- Marks DB., PHd. 2000. *Biokimia Kedokteran Dasar*. Jakarta: EGC.
- Mills S, Bone K. 2000. *Principles and Practise of Phytotherapy Modern Herbal Medicine*. Edenburg. London. New York. Sydney. Toronto. Churchill Livingstones.
- Mokgope, L. B. 2006. *Cowpea Seed Coats and Their Extracts : Phenolic Composition and Use as Antioxidants in Sunflower Oil*. Department of Food Science. University of Pretoria. South Africa. June 2006, Pg. 5-13.
- Mufidah, Marianti A Manggau, Ermina Pakki, Sybehan, Yulia Yusrini, D. 2010. Uji pendahuluan efek hipolipidemik dan penentuan indeks aterogenik pemberian ekstrak klika ongge (*Mezzetia Parviflovs* BECC.).
- Murray, R. K., Granner, D. K., & Rodwell, V. W. 2008 . *Biokimia Harper* (27 ed.). Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Naderi, G. A., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., & Shirvany, H. (2003). *Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. Molecular and Cellular Biochemistry*, 246, 193e. 196.
- Nair, PNR. 2004. *Pathogenesis of Apical Periodontitis and The Causes of Endodontic Failures*. Int and American Assc for Dent Research. 15(6):348-81.
- Nicholls SJ et al. 2010. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the asteroid trial. *JAMA* 2006;295:1556–1565.
- Singab, A. N., El-Beshbishy, H. A., Yonekawa, M., Nomura, T., & Fukai, T. (2005). Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 333e338.
- Siregar R.M., 2015, Antibacterial Activity of Kitolod (*Laurentia longiflora* (L). Peterm) Leaf and Flower Extact Against Several

- Conjunctivity Causing Bacteria, Bogor Agricultural University, 1 (L), 8.
- Srivastava RAK, Srivastava N, Avena M. Dietary Cholic Acid Lower Plasma Levels of Mouse and Human Apolipoprotein A-I Primarily Via Transcriptional Mechanism. *Eur.J.Biochem* 2000; 267: 4272-4280.
- Suryanto, E. 2012. *Fitokimia Antioksidasi*. Putra Media Nusantara. Surabaya.
- Sutedjo, A.Y. (2006). *Mengenal Penyakit Melalui Hasil Pemeriksaan Laboratorium*. Jakarta: Amara Books. Hal. 69-81.
- Taylor, F., K. Ward, T. Moore, M. Burke and S. Davey, 2013. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane DB. Syst. Rev.*, 1(5): 1-61.
- Toyo, E. M. 2015. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Murbei (*Morus australis* Poir.) Terhadap Kadar HDL dan Sel Busa Tikus Putih Jantan Galur Wistar [Skripsi]. Surakarta : Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.
- Usoro, C. A. O., C. C. Adikwuru, I. N. Usoro dan A. C. Nsanwu. 2006. Lipid profile of postmenopausal women in Calabar, Nigeria. *Pakistan J. Nutr.* 5 (1): 79-82.
- Valacchi, G., Belmonte, G., Miracco, C., Hyeyoon, and Lim, Y. 2013. Effects of combined mulberry leaf and fruit extract on liver and skin cholesterol transporters in high fat diet-induced obese mice. *Nutr Res Pract* 8(1): 20-26.

