

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PROANTOSIANIDIN DARI AKAR PAKIS TANGKUR (*Polypodium feei* METT) SECARA IN VITRO

Muchtaridi^{*}, Anas Subarnas^{*}, Nenden Indrayati^{}**

^{*} *Jurusan Farmasi FMIPA UNPAD*

^{**} *Jurusan Kimia FMIPA UNPAD*

ABSTRAK

Telah dilakukan pengujian aktivitas antioksidan senyawa proantosianidin dari akar pakis tangkur (*Polypodium feei* METT) dan interaksinya dengan α -tokoferol secara in vitro. Pengujian dilakukan terhadap malondialdehida, sebagai hasil peroksidasi lipid plasma pria sehat berusia antara 20-39 tahun secara spektrometri pada panjang gelombang 532 nm.

Dari hasil penelitian ini, senyawa proantosianidin pada dosis 2,78 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ memberikan aktivitas antioksidan yang berarti. Proantosianidin 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ memberikan aktivitas yang lebih kuat dibandingkan α -tokoferol.

Kata Kunci : pakis tangkur (*Polypodium feei* METT), Proantosianidin, Antioksidan

ABSTRACT

An investigation on antioxidant activity of proanthocyanidin isolated from the roots of Polypodium feet METT and its interaction with α – tocopherol has been carried out. The antioxidant activity was determined by measurement of malondialdehyde resulted from lipid peroxidation of blood plasma of healthy ménages from 20 to 39 years old by means of spectrophotometer at a wave length of 532 run.

The result of this investigation showed that proanthocyanidin at doses of 2,78 and 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ gave antioxidant activity significantly. The antioxidant activity of proanthocyanidin at a dose of 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ was stronger than that of α -tocopherol at a dose of 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. A combination of proanthocyanidin at a dose of 3.70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ gave stronger antioxidant activity as compared to that of proanthocyanidin and α – tocopherol individually. This evidence indicated that proanthocyanidin and α - tocopherol gave synergistic activity.

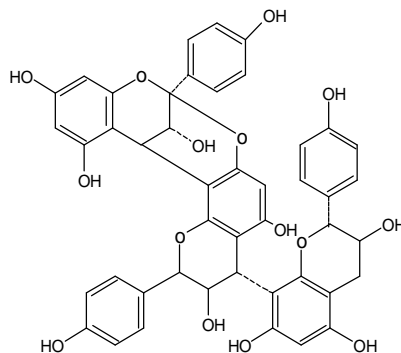
Keywords : pakis tangkur (*Polypodium feei* METT), Proanthocyanidin, Antioxidant

I. PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini antioksidan alami yang dapat meredam radikal bebas semakin lama semakin diminati karena dinilai mempunyai tingkat keamanan yang lebih baik dibandingkan dengan antioksidan sintetik¹.

Secara alami tumbuhan yang mengandung antioksidan tersebar pada berbagai bagian tumbuhan seperti akar, batang, kulit, ranting, daun, bunga dan biji. Umumnya, golongan antioksidan tersebut termasuk ke dalam golongan senyawa turunan fenolat seperti flavonoid, turunan senyawa hidoksinat, kumarin, tokoferol dan asam organik bermartabat banyak. Berdasarkan penelitian sebelumnya, senyawa tersebut bekerja sebagai penangkap oksigen, menagkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai².

Dewasa ini, telah diketahui bahwa senyawa-senyawa turunan proantosianidin seperti epikatekin, katekin dan galakatekin memiliki aktivitas antioksidan³ (Bahorun *et.al.*, 1993). Akar pakis tangkur (*Polypodium feei* METT) yang berasal dari sekitar Gunung Tangkuban Perahu diketahui mengandung proantosianidin⁴ (Subarnas dkk., 1997) yang belum dimanfaatkan secara umum sebagai antioksidan.



Gambar 1 Proantosianidin dari akar pakis tangkur⁴ (Subarnas dkk., 1997)

II. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

II.1 Bahan

II.1.1 Bahan tumbuhan

Akar pakis tangkur diperoleh dari kaki gunung Tangkuban Perahu, diambil pukul 10.00, dan spesimen dideterminasi di Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi, FMIPA UNPAD.

II.1.2 Bahan kimia

Proantosianidin murni diperoleh dari hasil penelitian Subarnas dkk. (1997), α -tokoferol (Sigma), CuCl_2 (Sigma) 2 mM, Asam tiobarbiturat (Sigma) 0,8 %, CH_3COOH p.a (Bratacco) pH 3,6 16,6 %, Na_2EDTA (Sigma) 2,98 %, NaOH (Bratacco) 1 N dan $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ p.a. Plasma darah : Sampel plasma darah diambil dari orang sehat (sesuai rujukan dokter) berusia 20-39 tahun.

II.2 Metode

II.2.1 Isolasi Proantosianidin dari akar pakis tangkur

Isolasi dilakukan berdasarkan metode yang telah dilakukan oleh Subarnas dkk.(1997). Serbuk akar pakis tangkur diekstraksi dengan MeOH secara maserasi selama tiga kali 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak dipekatkan dalam evaporator Buchi 022, ekstrak kental disimpan dalam cawan penguap. 10 gram ekstrak dipartisi dalam campuran heksan-air (3:1), kemudian kloform-air (3:1), etilasetat-air (3:1) dan n-butanol-air (3:1) sehingga diperoleh fraksi heksan, fraksi kloroform, fraksi etilasetat, faksi n-butanol dan fraksi air. Fraksi etilasetat dikromatografi kolom dengan menggunakan silika gel dengan fase gerak MeOH: H₂O. hasilnya kemudian hasilnya diuji kualitatif dengan kromatografi lapis tipis (fase gerak CHCl₃:MeOH:H₂O [7:3,5:0,25]) dengan membandingkan pada senyawa murni proantosianidin. Fraksi yang memiliki R_f sama difraksinasi lagi hingga mendapatkan senyawa murni proantosianidin.

II.2.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Metode pengujian menggunakan metode Asam Tiobarbiturat. 20 ml Darah diambil dari masing-masing sukarelawan yang telah mendapat persetujuan dari yang bersangkutan. Sampel darah disentrifugasi pada 4000 rpm selama 10 menit sehingga plasma terpisah. Sampel plasma dari masing-masing sukarelawan dibagi 6 kelompok dengan masing-masing 500 µl plasma dan diberi perlakuan sebagai berikut :

- Kelompok I : Kontrol Normal
- Kelompok II : Kontrol negatif (CuCl₂ 2mM)
- Kelompok III : Proantosianidin dosis 2,78 µg/50 µl + CuCl₂ 2 mM
- Kelompok IV : Proantosianidin dosis 3,70 µg/50 µl + CuCl₂ 2 mM
- Kelompok V : α-tokoferol 7,4 µg/50 µl + CuCl₂ 2 mM
- Kelompok VI : Proantosianidin + α-tokoferol 3,7 µg/50 µl + CuCl₂ 2 mM

Keenam perlakuan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 27°C, kemudian ditambahkan 200 µl SDS, 50 µl BHT, 50 µl EDTA, 1500 µl asam asetat, dan 1500 µl asam tiobarbiturat. Campuran dipanaskan dalam air mendidih selama 60 menit, kemudian didinginkan dalam es. Campuran disentrifugasi pada 2000 rpm selama 10 menit dan supernatan diukur absorbannya pada panjang gelombang 532 nm, tiap kelompok dibuat secara triplikat.

II.2.3 Analisis data

Data danalisis dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) model tetap, dengan faktor perlakuan kelompok I hingga VI, dan absorbansi sebagai respon, sedangkan uji lanjut digunakan uji T-Test.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

III.1 Isolasi dan Identifikasi Proantosianidin dai Akar Pakis Tangkur

1 gram Ekstrak kering didapatkan 166,5 mg senyawa proantosianidin yang berwarna coklat muda. Penambahan pereaksi FeCl_3 , H_2SO_4 , dan anisaldehyda- H_2SO_4 masing-masing memberikan warna; biru kehitaman; merah magenta dan merah oranye. Setelah dibandingkan dengan senyawa murni yang telah diisolasi terlebih dahulu, identifikasi ini spesifik untuk proantosianidin⁶. Hasil Kromatografi Lapis Tipis untuk fraksi Kromatografi kolom dengan CHCl_3 : MeOH 7:3 menghasilkan satu noda dengan Rf 0,5056, nilai ini sama dengan senyawa murni yang sudah ada.

III.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan

Hasil pengujian aktivitas antioksidan senyawa proantosianidin dari akar Pakis Tangkur (*Polypodium feei* METT) dan interaksinya dengan α -tokoferol terlihat pada Tabel I.

Tabel I.
Absorbansi rata-rata MDA plasma total kelompok usia 20-39 tahun

Sampel	Kelompok					
	I	II	III	IV	V	VI
1	0,1170	0,1850	0,1517	0,1633	0,1183	0,0900
2	0,1783	0,2233	0,1633	0,1567	0,1433	0,0733
3	0,1200	0,1383	0,1017	0,1067	0,0857	0,0633
4	0,3617	0,3800	0,1067	0,3100	0,2530	0,2100
5	0,3100	0,3433	0,3100	0,2100	0,1777	0,1567
Jumlah	1,1417	1,2699	1,0434	0,9467	0,7780	0,6099
Rata-rata \pm SD	0,2283 \pm 0,0458	0,2539 \pm 0,0463	0,1947 \pm 0,0357*	0,1873 \pm 0,0357*	0,1565 \pm 0,0286**	0,1186 \pm 0,0384**

Keterangan :

Kelompok I : Kontrol Normal

Kelompok II : Kontrol negatif (CuCl_2 2mM)

Kelompok III : Proantosianidin dosis 2,78 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ + CuCl_2 2 mM

Kelompok IV : Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ + CuCl_2 2 mM

Kelompok V : α -tokoferol 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ + CuCl_2 2 mM

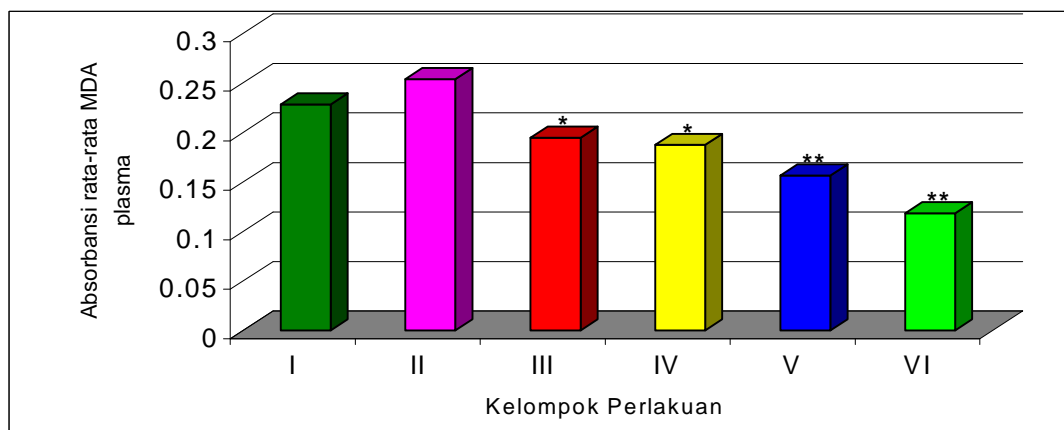
Kelompok VI : Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ + CuCl_2 2 mM + α -tokoferol 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ + CuCl_2 2 mM

* Berbeda bermakna terhadap kontrol negatif pada taraf nyata 0,05, harga $p < 0,05$

** Berbeda sangat bermakna terhadap kontrol negatif pada taraf nyata 0,05, harga $0,001 < p < 0,05$

Secara statistik, dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan model tetap, keenam kelompok perlakuan memberikan perbedaan yang berarti. Uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa pemberian α -tokoferol dengan dosis 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, Proantosianidin dosis 2,78 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan kombinasi antara Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan α -tokoferol 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ menghasilkan perbedaan penurunan absorbansi MDA yang berarti. Hasil pemberian kombinasi Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan α -tokoferol 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ yang dibandingkan terhadap α -tokoferol 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ atau terhadap Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ secara terpisah menunjukkan penurunan absorban MDA yang berarti.

Hasil uji T-test dengan tipe berpasangan pada arah dua sisi, didapatkan bahwa yang memberikan aktivitas antioksidan adalah kombinasi Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan α -tokoferol 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$, dengan t-hitung lebih besar dibandingkan tabel kepercayaan 95 % dan 99,9 %, disusul oleh Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ dan Proantosianidin dosis 2,78 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$. Keterangan tersebut ditunjukkan dengan jelas pada grafik absorbansi rata-rata MDA plasma pada grafik Gambar 2.



Gambar 2 Grafik basorbansi rata-rata MDA plasma antara kelompok perlakuan.

Keterangan :

Kelompok I : Kontrol Normal, Kelompok II : Kontrol negatif (CuCl_2 2mM), Kelompok III : Proantosianidin 2,78 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} + \text{CuCl}_2$ 2 mM, Kelompok IV: Proantosianidin 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} + \text{CuCl}_2$ 2 mM, Kelompok V: α -tokoferol 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} + \text{CuCl}_2$ 2 mM, Kelompok VI : Proantosianidin + α -tokoferol 3,7 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l} + \text{CuCl}_2$ 2 mM.

* Berbeda bermakna terhadap kontrol nrgatif pada taraf nyata 0,05, harga $p < 0,05$

** Berbeda sangat bermakna terhadap kontrol nrgatif pada taraf nyata 0,05, harga $0,001 < p < 0,05$

Dari kedua hasil uji statistik di atas, diketahui bahwa proantosianidin dari akar pakis tangkur dan kombinasinya dengan α -tokoferol memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Proantosianidin dosis 3,70 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ memiliki aktivitas lebih kuat dibandingkan dengan α -tokoferol 7,4 $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ secara in vitro. Proantosianidin memiliki aktivitas sinergistik dengan α -tokoferol.

Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Bahorun *et al.*(1993) Menurutnya, proantosianidin dari *Crataegus monogyna* telah diketahui menghambat malondealdehida³. Kekuatan aktivitas antioksidan senyawa-senyawa sianidin termasuk proantosianidin sangat berhubungan erat dengan struktur senyawa tersebut. Umumnya, penangkapan radikal bebas atau aktivitas antioksidan tergantung pada posisi dan jumlah gugus hidoksil (-OH) aromatik yang merupakan penyumbang proton. Senakin banyak jumlah gugus aromatik-OH pada posisi yang aktif mendonasi proton, maka makin kuat aktivitasnya⁵ (Cai-Yizhong *et al.*, 2003). Senyawa proantosianidin daari akar pakis tangkur memilki gugus aromatik-OH yang banyak dan berada pada posisi yang memungkinkan untuk donasi proton pada radikal bebas

IV. KESIMPULAN

Proantosianidin dari akar pakis tangkur (*Polypodium feei* METT) dosis 2,78 µg/50 µl dan 3,7 µg/50 µl memberikan aktivitas antioksidan yang berarti. Proantosianidin 3,7 µg/50 µl memberikan aktivitas yang lebih kuat dibandingkan α-tokoferol pada dosis yang sama. Kombinasi proantosianidin dan α-tokoferol memberikan aktivitas antioksidan lebih kuat dibandingkan senyawa tunggalnya masing-masing pada dosis yang sama, sehingga dapat disimpulkan bahwa proantosianidin memiliki aktivitas antioksidan yang sinergik dengan α-tokoferol.

V. DAFTAR PUSTAKA

1. Puspitasari, W.P.R., Nuri Andarwulan. Sifat Antioksidan dan Antimikroba Rempah-rempah dan Bumbu Tradisional. Makalah dipresentasikan pada Seminar Sehari Khasiat dan Keamanan Rempah, Bumbu, dan Jamu Tradisional. Bogor: IPB. 1997: hlm 2-8
2. Clifford A. Hall and Susan L. Cuppet. Structure-Activities of Natural Antioxidants *in* Okezie I. Aruoma nad susan L. Cuppet, editors. *Antioxidant Methodology*. Illinois: AOCS Press. 1997: p. 163-168
3. Bahorun, T. Antioxidant Activites of Crataegus monogyna extracts. *J. Planta Medicinal*; 1993; 12: 323-325
4. Subarnas, A. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Analgesik dari Akar Pakis Tangkur. (*Polypodium feei* METT). *Laporan Penelitian Hibah Bersaing IV/1, IV/2* Perguruan Tinggi. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi. 1997: hlm. 24
5. Cai-Yizhong, Qiong Luo, Mei Sun, Harold Corke. Antioxidant activity and Phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 2004; 74 : 2157–2184.
6. Baeck, N-I., Chung MS., Shanon L., Kardono LS., Tsauri S., Padmawinata K., Pezzuto JM., Soejarto D.D., Konghorn, A.D. 1993. Shelliguaeain A., a novel highly sweet proatnthocyanidin from rhizome of *Sheliguea feei*. *Natural Product* 1993 ; 56: 1532-1538.