

Uji Aktivitas Antioksi dan Rebusan Daun Dewa (*Gynura Pseudochina*) dan Perannya Sebagai Inhibitor *Advanced Glycation End Products* (Ages) Akibat Reaksi Glikosilasi

Antioxidant Activity of Daun Dewa Leaf Boiled (*Gynura Pseudochina*) and Its Role as Inhibitor of Advanced Glycation end Products (AGES) by Glycosilation

Eko Suhartono*, Bambang Setiawan**,
Edyson***, Nur Yulia Sari****

* Bagian Kimia Kedokteran

** Kelompok Studi Radikal Bebas dan Pemanfaatan Bahan Alam

*** Bagian Biokimia

**** Mahasiswa PS. Pendidikan Dokter

FK. Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru, Kalimantan Selatan

Abstract

*The research of an antioxidant activity of Daun Dewa leaf boiled (*Gynura pseudochina*) and the role as inhibitor of advanced glycation end products (AGEs) formation in vitro had been done. Aims of this research are to measure an antioxidant activity by Daun Dewa leaf boiled and the role as inhibitor of AGEs formation. The methods, to measured an antioxidant activity by Daun Dewa leaf boiled is reacted with 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) and analyzed with spectrophotometry methods with $\lambda=390$ nm. Meanwhile, AGEs compounds is measure every 48 hours during 20 days of research and analyzed with spectrophotometry methods with $\lambda=340$ nm Content of dicarbonyl compounds is measured with DNPH methods that developed by Uchida and modified by Sadikin. The result, showed that an antioxidant activity of Daun Dewa leaf boiled at 25% concentration is $66,34 \pm 3,72$ %. On the other hand, is able to block rate of AGEs formation.*

Key words: *antioxidant, boiled, Daun Dewa leaf, AGEs*

Abstrak

Telah dilakukan penelitian aktifitas antioksidan rebusan daun tanaman Daun Dewa dan perannya sebagai penghambat pembentukan AGEs. Penelitian ini bertujuan menentukan aktifitas antioksidan rebusan daun tanaman Daun Dewa dan perannya sebagai penghambat pembentukan AGEs. Untuk penentuan aktivitas antioksidan, rebusan daun tanaman Daun Dewa direaksikan dengan 2,4-dinitrophenylhydrazin (DNPH) dan dianalisis secara spektrofotometri pada $\lambda = 390$ nm. Senyawa AGEs diukur setiap 48 jam selama 20 hari dengan menggunakan spektrofotometri pada $\lambda = 340$ nm. Kadar senyawa dikarbonil ditentukan dengan cara metoda DNPH yang dikembangkan Uchida dan dimodifikasi oleh Sadikin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktifitas antioksidan rebusan daun tanaman Daun Dewa konsentrasi 25% adalah $66,34 \pm 3,72\%$. Selain itu, daun Dewa juga dapat menghambat pembentukan AGEs.

Kata kunci : antioksidan, rebusan, daun tanaman Daun Dewa, AGEs

Pendahuluan

Tanaman daun dewa (*Gynura pseudochina*) merupakan salah satu jenis tanaman asli Indonesia, yang dapat digunakan sebagai obat.^{1,2} Tanaman ini dimanfaatkan untuk mengobati hipertensi, tidak datang haid, tumor, kanker, dan diabetes mellitus.^{3,4}

Tanaman daun dewa ditemukan pertama kali di Papua. Tanaman ini mengandung bahan kimia aktif, antara lain saponin, flavonoid, alkaloid, tannin, dan minyak atsiri.^{5,6} Disamping itu, tanaman daun dewa juga mengandung isoproskridase, yang dapat berperan sebagai antioksidan enzimatik.⁷

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menghambat atau mencegah reaksi oksidasi. Berbagai macam reaksi oksidasi, salah satunya adalah reaksi glikosilasi atau reaksi Maillard. Reaksi glikosilasi adalah reaksi nonenzimatik antara gugus amina protein dengan gugus aldehid dari glukosa, yang selanjutnya akan menghasilkan senyawa dikarbonil dan *Advanced Glycation End Products* (AGEs).

Advanced Glycation End Products (AGEs) merupakan senyawa hasil reaksi Maillard yang bersifat ireversibel. Reaksi ini dicirikan dengan terjadinya pencokelatan nonenzimatik antara gula pereduksi dan asam amino bebas yang reaktif dari protein.⁸

Di bidang kedokteran, reaksi pembentukan AGEs diduga turut mendasari komplikasi pada diabetes melitus. Pada diabetes melitus, reaksi diawali dengan keadaan hiperglikemia, yang selanjutnya akan meningkatkan pembentukan basa Schiff antara gugus aldehid glukosa dengan residu lisin, arginin, dan histidin. Reaksi yang bekerja secara non enzimatik tersebut, setelah 24-48 jam, akan terjadi penataan ulang pada basa Schiff menjadi bentuk yang lebih stabil. Produk yang lebih stabil itu disebut produk Amadori dan melalui serangkaian reaksi lanjutan akan membentuk AGEs.⁹

Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa, akumulasi AGEs di berbagai jaringan dapat meningkatkan stress oksidatif.¹⁰ Hasil penelitian Ueno,¹¹ juga mengungkapkan bahwa akumulasi AGEs akibat diabetes, secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak.

Penelitian Vozyan¹² mengungkapkan bahwa reaksi glikosilasi yang membentuk AGEs secara *in vitro*, dapat dihambat oleh piridoksamin dengan cara meredam senyawa karbonil dan pengikatan ion logam bidentat. Selain piridoksamin, beberapa tanaman obat juga dapat menghambat pembentukan senyawa dikarbonil hasil reaksi glikosilasi.¹³⁻¹⁵ Akan tetapi, penelitian yang berkaitan dengan hal tersebut belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini ingin dikaji aktivitas antioksidan rebusan daun dewa dan perannya dalam menghambat pembentukan AGEs. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi acuan penelitian selanjutnya, terutama yang berkaitan dengan pemanfaatan obat tradisional.

Bahan dan Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan di lab. Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru pada bulan April-Juni 2004. Tanaman daun dewa yang digunakan pada penelitian ini diambil pada bulan April 2004, yang diperoleh dari Tanaman Obat Keluarga di Loktabat Banjarbaru, Kalimantan Selatan. Bahan kimia yang digunakan meliputi glukosa 500 mg/L, buffer fosfat pH 7,4, BSA 30%, aquadest, NaOH, etanol 70% dan 10%, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), HCl 2,5 M, asam trikloroasetat (TCA) 20 % dan 10%, asam asetat 10 %, urea 9 M, serta NaOH 0,4 N, derivat vitamin E merk Evion dalam buffer fosfat pH = 7,4 (digunakan sebagai larutan standar), Fe-EDTA, H₂O₂ 10 mmol/ltr, dan etanol-etil asetat. Keseluruhan bahan kimia yang digunakan merupakan bahan pure analisis (p.a)

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat gelas (Pyrex[®]), pH meter (Cyberscan[®]), sentrifuge (Centurion[®]), stopwatch (Hanhart[®]), vortex (VM-300[®]), mikrobator (Heto[®]), neraca analitik (Gibertini[®] e425-b), mikropipet (Transferpette[®]), dan spektrofotometer (Biosystems[®] BTS-305).

Persiapan sampel

Sampel daun tanaman daun dewa dibuat berdasarkan kebiasaan yang dilakukan oleh masyarakat di Kalimantan Selatan. Caranya, daun tanaman daun dewa sebanyak 10 lembar (\pm 25 gram) direbus dengan 200 ml air. Perebusan dihentikan, ketika volume air menjadi 100 ml. Konsentrasi rebusan ini adalah 25%.

Uji Potensi Antioksidan

Rebusan tanaman daun dewa 25% sebanyak 0,01 ml dan BSA 30% dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi reagen reaksi Fenton. Radikal bebas yang terbentuk dari reaksi tersebut kemudian bereaksi dengan bovine serum albumin (BSA), sehingga terbentuk senyawa dikarbonil. Gugus karbonil yang terbentuk tersebut kemudian direaksikan dengan senyawa 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH). Reaksi tersebut akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna, yang merupakan hasil kondensasi antara DNP dengan senyawa karbonil tersebut. Senyawa berwarna tersebut absorbansinya diukur dengan spektrofotometer pada $\lambda = 390$ nm.¹⁷ Perhitungan aktivitas antioksidan ditentukan dengan persamaan :

$$AOA = \frac{(\Delta K - \Delta A)}{(\Delta K - \Delta AU)} \times 100\%$$

Keterangan:

AOA = Aktivitas antioksidan (%)

ΔK = Absorbansi kontrol ($K_1 - K_0$)

ΔA = Absorbansi sampel ($A_1 - A_0$)

ΔAU = Absorbansi derivat vitamin E ($E_1 - E_0$)

Pengukuran absorbansi senyawa AGEs dan kadar senyawa dikarbonil.

Untuk mengukur absorbansi AGEs dan kadar senyawa dikarbonil, terlebih dahulu disiapkan 3 larutan. Larutan tersebut terdiri atas larutan A (kontrol), yang berisi BSA 30%+buffer fosfat pH 7. Larutan B berisi BSA30%+glukosa 500 mM, larutan C berisi BSA30%+glukosa 500 mM+rebusan tanaman daun dewa 25%. Ketiga macam larutan tersebut, kemudian disimpan di dalam oven pada suhu 37°C.

Absorbansi senyawa AGEs diukur setiap 48 jam selama 20 hari. Caranya dengan mengambil sebanyak 0,5 ml larutan dari masing-masing larutan uji, kemudian diukur serapannya pada $\lambda = 340$ nm. Kadar senyawa dikarbonil ditentukan dengan metoda DNPH yang dikembangkan oleh Uchida¹⁶ dan dimodifikasi oleh Sadikin¹⁷

Hasil dan Pembahasan

Rata-rata hasil uji aktivitas antioksidan rebusan daun tanaman daun dewa sebesar $66,34 \pm 3,72\%$. Hasil pengujian secara lengkap disajikan pada tabel 1.

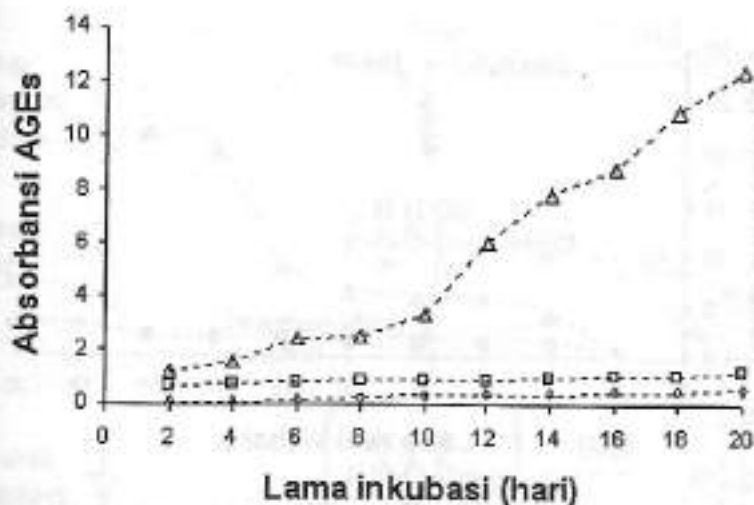
Tabel 1. Aktivitas Antioksidan Rebusan Daun Tanaman Daun Dewa

Ulangan	Absorbansi sampel	Absorbansi kontrol	Absorbansi Standard	AAO (%)
1	0,0030	0,0178	0,0055	63,52
2	0,0023	0,0162	0,0035	70,58
3	0,0034	0,0171	0,0040	64,93
Rerata \pm SD				66,34 \pm 3,72

Keterangan: AAO = aktivitas antioksidan

Aktivitas antioksidan ini menunjukkan kemampuan rebusan daun tanaman daun dewa menangkap radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi Fenton. Radikal hidroksil hasil reaksi Fenton tersebut, merupakan hasil reduksi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , yang selanjutnya bereaksi dengan H_2O_2 hingga terbentuk radikal hidroksil.

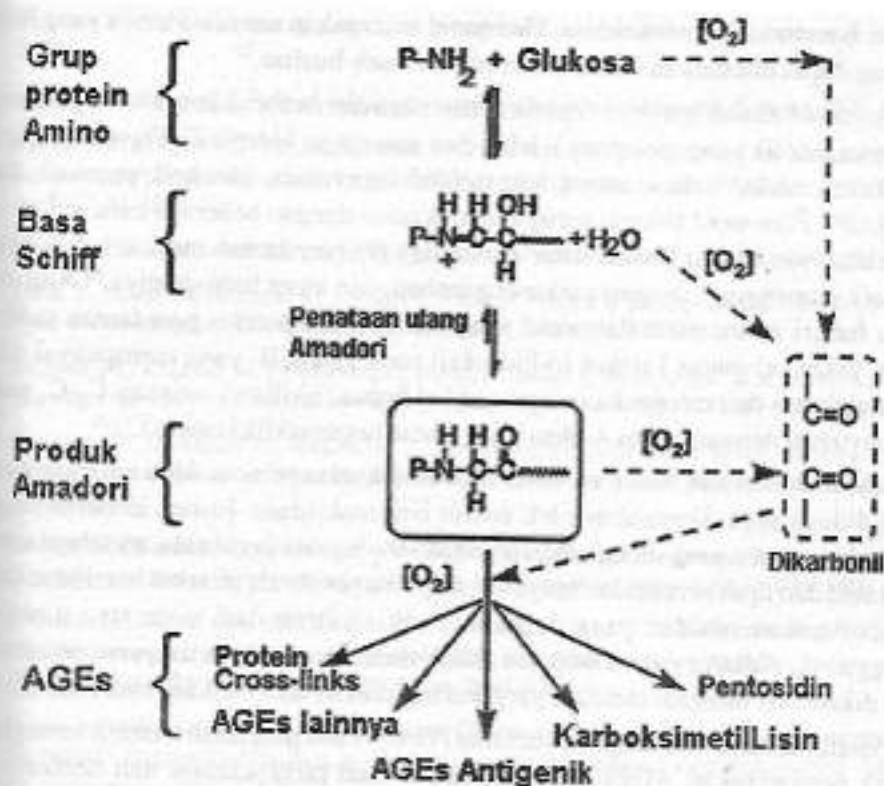
*Tepat ini bisa diin' sraian
d. bawanya*



Gambar 1. Laju pembentukan AGEs berdasarkan nilai absorbansinya. Laju pembentukan AGEs larutan B, yakni larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM (---) lebih besar daripada larutan A (---) dan larutan C, yaitu larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM+rebusan daun tanaman daun dewa 25% (-□-)

Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh rebusan daun tanaman daun dewa, berperan dalam menghambat laju pembentukan AGEs. Hasil penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan laju pembentukan AGEs tanpa pemberian rebusan daun tanaman daun dewa berlangsung sangat cepat. Akan tetapi, setelah pemberian rebusan daun tanaman daun dewa ternyata pembentukan AGEs dapat dihambat. Hal ini dapat dilihat pada gambar 1.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa laju pembentukan senyawa karbonil tanpa dan dengan pemberian rebusan daun tanaman daun dewa. Hal ini dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 3. Mekanisme pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil

Tahap kedua terjadi sesudah berlangsung beberapa hari, yakni terjadinya serangkaian perubahan melalui proses jalur oksidatif, non-oksidatif, maupun penataan ulang. Pada jalur oksidatif terbentuk senyawa N-karboksimetilisin (CML) dan pentosidin. Pada jalur non-oksidatif dihasilkan senyawa pirlin dan proses penataan ulang akan dihasilkan 3-deoksiglukoson (3-DG). Selanjutnya, tahap ketiga akan menghasilkan senyawa yang sangat tidak stabil dan reaktif. Senyawa intermediet yang terbentuk pada tahap kedua akan bereaksi secara polimerisasi dengan struktur protein membentuk senyawa AGEs.⁹

Berdasarkan gambar 3, senyawa dikarbonil merupakan senyawa intermediet yang menyokong pembentukan AGEs. Dengan kata lain, peningkatan senyawa dikarbonil akan diikuti oleh pembentukan AGEs. Dengan demikian, untuk menghambat laju pembentukan senyawa dikarbonil dan AGEs diperlukan senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Senyawa itu salah satunya terdapat pada daun tanaman daun dewa.

Rebusan daun tanaman daun dewa dapat menghambat laju pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil diduga karena kandungan kimia yang dimilikinya, yakni fla-

vonoid dan enzim isoperoksidase. Flavonoid merupakan senyawa kimia yang larut air yang dapat ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan.²⁰

Flavonoid adalah senyawa organik bahan alam dan merupakan senyawa polifenol (senyawa fenolik yang mempunyai lebih dari satu gugus hidroksil). Flavonoid dapat mereduksi radikal bebas, antara lain radikal superoksida, alkoksil, peroksil, dan hidroksil¹⁶. Flavonoid bekerja sebagai antioksidan dengan beberapa cara, yakni (a) pengelatan ion logam (*metal ionic chelating*) (b) peredaman radikal bebas (*free radicals scavenging*) dengan cara menyumbangkan atom hidrogennya.²⁰ Ada dua gugus fungsi utama pada flavonoid yang menentukan potensi peredaman radikal bebas, yakni (a) gugus katekol (o-hidroksi) pada cincin B, yang mempunyai sifat donor elektron dan merupakan target radikal bebas (b) ikatan rangkap C₂-C₃ yang berkonyugasi dengan gugus 4-okso pada cincin heterosiklik (cincin C).²⁰

Selain diperankan oleh flavonoid, sifat antioksidan perasan daun tanaman daun dewa diduga juga diperankan oleh enzim isoperoksidase. Enzim isoperoksidase merupakan enzim yang mengkatalisis senyawa-senyawa peroksida, misalnya asam peroksida dan lipid peroksida. Senyawa-senyawa peroksida tersebut bersifat reaktif dan merupakan oksidan yang dapat menarik elektron dari atom atau molekul tetangganya. Adanya enzim isoperoksidase tersebut, senyawa-senyawa peroksida akan dikatalisis menjadi molekul yang kurang reaktif atau bahkan tidak reaktif.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian Price.²⁰ Pada penelitian tersebut terungkap bahwa pembentukan AGEs dapat dihambat oleh piridoksamin dan derivatnya. Penghambat tersebut melalui *chelating* logam dan *scavenger* dikarbonil.

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan rebusan daun tanaman daun dewa (*Gynura pseudochina*) konsentrasi 25% adalah 66,34±3,72%. Selain itu, rebusan daun tanaman daun dewa dapat menghambat pembentukan Advanced Glycation End Products (AGEs)

Daftar Pustaka

1. Anonimous. *Daun dewa*. www.changjaya-abadi.com.2002.
2. Anonimous. *Tanaman obat Indonesia*.www.iptek.net.id.2002.
3. Saharmati, MH. *Khasiat dan manfaat daun dewa dan sambung nyawa*. Jakarta: PT.Agromedia Pustaka. 2003.
4. Singh AP. *A treatis on phytochemistry*; Emedia Science.2002.
5. Winarto WP. *Memfaatkan bumbu dapur untuk mengatasi aneka penyakit*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka; 2002.
6. Wiryowidagdgo S, Sitanggang M. *Tanaman obat untuk penyakit jantung, darah tinggi, dan kolesterol*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka; 2002.

7. Prewitt T. *The production of peroxidase from plants in the thachin basin*. www.surdi.su.ac.th. 1992.
8. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
9. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51:3274-82.
10. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82:47-95.
11. Ueno Y, Kizaki M, Nakagiri R, Kamiya T, Sumi H, Osawa T. Dietary glutathione protects rats from diabetic nephropathy and neuropathy. *J. Nutr.* 2002; 132:897-900.
12. Vozriyan PA, Khalifah R, Thibaudedeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of protein in vitro by physiological levels of glucose. *J Biol Chem.* 2003; 278; 47:46616-24.
13. Budianto R., Qamariah N., Suhartono E., Potensi infuse daun pare (*Momordica charantia*) sebagai penghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi in vitro. *Majalah Obat Tradisional*, 2003;8:25
14. Firdaus RT, Qamariah N., Suhartono E., Pemodelan reaksi glikosilasi dan peran infuse daun tapak dara (*Chatharantus roseus* [L.] G.Don) sebagai penghambat kerusakan protein. *B.I.Ked.* 2004;36(1):1-6
15. Budianto R., Damayanthi ED., Firdaus RT., Paramita D., Vianti TA., Suhartono E., Uji aktifitas antioksidan pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack.) dan perannya dalam menghambat kerusakan protein akibat reaksi glikosilasi. *Review Kimia.* 2004;3(3):1-6
16. Valencia JV, Weldon SC, Quinn D. Advanced Glycation End Product ligand for the receptor for Advanced Glycation End Product: biochemical caharacterization and formation kinetics. *Analytical Biochemistry* 2004; 324:68-78.
17. Sadikin M. *Pelacakan dampak radikal bebas terhadap biomolekul*. Disampaikan pada Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan : Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan alam, Jakarta, 16 April, 2001.
18. Uehida K, Kanematsu M, Sakai K, Matsuda T, Hattori Dan, Mizuno Y, et al. Protein bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:4882-7.
19. Eze C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO. Oxidation-reduction propertisof methyglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem* 1998; 273:39.
20. Price DL., Rbett PM., Thorpe SR., Baynes JW., Chelating activity of Advanced Glycation End Products (AGEs) inhibitors. *J.Bio Chem* 2001;276:4896-2
21. Middleton E., kandaswami L., Theoharis. The Effect of Plant Flavonoids, on Mammalian Cells: Implication for inflammation, heart disease, and cancer, *Pharmacol Rev* 2000; 52:673-751