

AKTIVITAS EKSTRAK BUAH MAKASAR (*Brucea Javanica* L. Merr) TERHADAP RADIKAL ANION SUPEROKSIDA SECARA *IN VIVO*

Oleh

Ari Widiyantoro, Elvi Rusmiyanto Pancaning Wardoyo, dan Endah Sayekti
Staf Pengajar FMIPA Universitas Tanjungpura Pontianak

Abstract

*Activity of scavenging radical anion superoxide by extract of Makasar fruit (*Brucea javanica* L. Merr) have been research with methods of inhibition reduction nitroblue tetrazolium, by in vivo on rat Wistar induction with aflatoxin. Results showed there are inhibition reduction of nitroblue tetrazolium by methanol extract, methanol fraction, ethylacetate fraction, methylen chloride fraction and n-hexane fraction.. Phytochemical test showed alkaloid, terpenoid, quinone, polyphenol and steroid.*

Key words : Brucea javanica L. Merr, radical anion superoxide, nitroblue tetrazolium, aflatoxin

PENDAHULUAN

Pemanfaatan bahan tumbuhan untuk obat tradisional, pada dasarnya berkaitan dengan adanya senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan tersebut yang memiliki aktivitas biologik tertentu. Senyawa aktif tersebut dapat bekerja secara sendiri maupun bersinergi dengan senyawa aktif lainnya. Oleh karena itu pemanfaatan tumbuhan untuk pencegahan dan penanganan penyakit dapat berupa ekstrak (*multicompounds*) maupun suatu senyawa tunggal (*single compound*). Berdasarkan kajian penelitian menunjukkan bahwa senyawa-senyawa antioksidan cenderung bekerja secara sinergis.

Reumatik adalah inflamatori (peradangan) yang disebabkan karena adanya radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$), yang diproduksi oleh fagosit. Senyawa yang berasal dari aktivitas fagosit berperan dalam proses

peradangan sebagai bagian reaksi inflamatori yang terkontrol. Bila fagosit terdapat dalam jumlah yang besar, maka akan terjadi keadaan stress oksidatif. Untuk mencegah terjadinya peradangan tersebut tubuh manusia mempunyai sel-sel khusus yaitu sel-sel radang (*inflammatory cells*) (Halliwell, 1994). Pencegahan penyakit degeneratif yang disebabkan oleh keadaan stress oksidatif oleh bahan alam seperti sayur-sayuran dan buah-buahan sebagai sumber antioksidan sejauh ini terbukti efektif. Untuk menanggulangi oksidasi terhadap sel, tubuh dilindungi oleh sistem perlindungan antioksidan yang terdiri atas sistem antioksidan yang berasal dari dalam tubuh (endogen) dan yang diperoleh dari luar tubuh (eksogen).

Antioksidan digolongkan menjadi dua yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder. Antioksidan primer adalah anti-

oksidan yang sifatnya sebagai pemutus rantai yang dapat bereaksi dengan radikal-radikal lipid dan mengubahnya menjadi produk yang relatif stabil. Antioksidan sekunder adalah antioksidan preventif atau pencegah terbentuknya radikal dan oksigen reaktif. Mekanisme antioksidan primer terbagi atas dua yaitu: (1) Pemutusan rantai dengan mekanisme donor hidrogen dari gugus hidroksil inti fenol. Substitusi pada posisi *orto* terhadap gugus hidroksil inti fenol akan meningkatkan aktivitas pendonasian hidrogen, sedangkan tidak adanya substitusi akan memberikan sifat antioksidan yang kurang aktif. (2) Pemutusan rantai dengan cara akseptor. Struktur utama antioksidan akseptor dicirikan dengan adanya kuinon. Keefektifannya dihasilkan oleh adanya gugus yang melepaskan elektron pada posisi *orto* (Garcia *et al.*, 1997).

Antioksidan yang cara bekerjanya dapat mencegah pembentukan radikal bebas yang baru dan mengubah radikal bebas menjadi molekul yang tidak berbahaya di antaranya Superoksida Dismutase (SOD), yang mengubah radikal anion superoksida menjadi hidrogen peroksida. Superoksida Dismutase adalah enzim antioksidan yang terdapat dalam sitosol dan mitokondria yang berfungsi sebagai pertahanan tubuh terhadap radikal bebas yaitu radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot(-)}$). Enzim SOD berfungsi sebagai

katalisator yang mengubah radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot(-)}$) yang dihasilkan selama proses energi oksidatif menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) sehingga radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot(-)}$) ini tidak dapat menyerang sel tubuh (Halliwell, 1994).



Buah Makasar (*Brucea javanica* L. Merr) merupakan salah satu spesies tanaman dalam Famili Simaroubaceae. Famili Simaroubaceae kebanyakan mengandung golongan senyawa alkaloid, terpenoid, kuasinoid, dan steroid. Penelusuran pustaka menunjukkan buah makasar mempunyai aktivitas antimikroba, antiinflamasi, antioksidan, antimalaria, antitumor, antikanker dan anti TBC (Wang *et al.*, 2003; Rahman, *et al.*, 1997; Fukamiya *et al.*, 1992). Penelitian mengenai antiinflamasi dan antioksidan mempunyai banyak sudut pandang dan parameter. Pada penelitian ini dipelajari efek antioksidan dari ekstrak buah makasar terhadap radikal anion superoksida yang merupakan penyebab peradangan.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di FMIPA Universitas Tanjungpura dan FMIPA Universitas Padjajaran Bandung. Sampel buah makasar diambil dari hutan Taman Nasional Gunung Palung, Ketapang. Sampel

dilakukan determinasi di Herbarium Bogoriense Pusat Penelitian Biologi LIPI Bogor.

Sampel dilakukan pengeringan angin tanpa terkena sinar matahari. Selanjutnya sampel diblender dan dilakukan maserasi menggunakan metanol 80% yang telah didestilasi ulang. Ekstraksi secara maserasi tersebut dilakukan selama 4 x 24 jam. Ekstrak kental metanol yang diperoleh setelah dilakukan evaporasi terhadap filtrat hasil maserasi selanjutnya dilakukan partisi dengan menggunakan pelarut yang mempunyai kepolaran berbeda-beda. Hasil partisi berupa fraksi *n*-heksan, metilen klorida, etil asetat dan metanol. Ekstrak dan fraksi buah Makasar selanjutnya diuji aktivitas peredaman radikal anion superoksida secara *in vivo* (terhadap tikus galur Wistar) dengan metode NBT.

Percobaan ini dilakukan selama 15 hari. Selama 15 hari, tikus diberi berbagai dosis antioksidan ekstrak buah makasar, vitamin E, dan vitamin C. Antioksidan diberikan setiap hari, sedangkan aflatoksin dengan dosis 187,5 µg/kg BB diberikan pada hari pertama dan hari ke delapan sehingga total dosis yang diberikan dalam 15 hari adalah 375 µg/kg BB. Pemberian antioksidan dilakukan satu jam sebelum pemberian aflatoksin. Pada percobaan ini diberikan juga antioksidan komersial berupa vitamin E dan

vitamin C yang berguna sebagai pembanding untuk mendapatkan antioksidan yang paling baik.

Percobaan ini dilakukan secara eksperimental dengan menggunakan pola Rancangan Acak Lengkap. Setiap perlakuan dilakukan 3 kali ulangan. Percobaan ini terdiri atas enam perlakuan dan satu kontrol, yaitu:

- T₁ : kontrol, tanpa antioksidan, tanpa aflatoksin
- T₂ : tanpa antioksidan, diberi aflatoksin
- T₃ : vitamin E 60 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₄ : vitamin C 60 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₅ : ekstrak metanol buah makasar 20 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₆ : ekstrak metanol buah makasar 40 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₇ : ekstrak metanol buah makasar 80 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₈ : fraksi metanol buah makasar 20 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₉ : fraksi metanol buah makasar 40 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₁₀ : fraksi metanol buah makasar 80 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₁₁ : fraksi etil asetat buah makasar 20 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₁₂ : fraksi etil asetat buah makasar 40 mg/kg BB/hari, aflatoksin
- T₁₃ : fraksi etil asetat buah makasar 80 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₄ : fraksi metilen klorida buah makasar 20 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₅ : fraksi metilen klorida buah makasar 40 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₆ : fraksi metilen klorida buah makasar 80 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₇ : fraksi *n*-heksan buah makasar 20 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₈ : fraksi *n*-heksan buah makasar 40 mg/kg BB/hari, aflatoksin

T₁₉ : fraksi *n*-heksan buah makasar 80 mg/kg BB/hari, aflatoksin

Parameter yang diukur adalah aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) (Murakami *et al.*, 1997; Ogata, 1997).

Ekstrak/fraksi buah makasar ditimbang sesuai dengan kebutuhan, yaitu 20 mg, 40 mg, dan 80 mg. Vitamin E dan vitamin C ditimbang sebanyak 60 mg. PGA ditimbang sebanyak 0,2 mg. Sebanyak 20 mL aquades dipanaskan kemudian PGA ditambahkan dan diaduk hingga larut. Selanjutnya, antioksidan dimasukkan dan diaduk.

Tikus diberi berbagai dosis ekstrak/fraksi buah makasar (20 mg/kg BB, 40 mg/kg bb, 80 mg/kg BB), vitamin E 60 mg/kg BB, dan vitamin C 60 mg/kg BB secara oral setiap hari selama 15 hari. Aflatoksin dengan dosis 375 µg/kg BB diberikan pada hari ke satu dan hari ke delapan. Pemberian aflatoksin dilakukan satu

jam setelah pemberian antioksidan. Pengukuran parameter dilakukan pada hari ke enam belas setelah hewan percobaan dimatikan. Pengukuran parameter dilakukan dengan mereaksikan supernatannya dengan pereaksi NBT.

Tabung eppendorf volume 2 mL disiapkan untuk membuat larutan uji. Enzim yang akan digunakan terlebih dahulu diencerkan dengan buffer fosfat 0,1 M pH 8. Larutan sampel dibuat dengan memasukkan 12,5 µL sampel dan 250 µL campuran xantin-NBT ke dalam tabung eppendorf kemudian 250 µL enzim XOD ditambahkan terakhir. Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan SDS sebanyak 500 µL. Pengukuran aktivitas penghambatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm dan absorban dicatat sebagai E_s.

Larutan kontrol dibuat dengan memasukkan 12,5 µL dimetil sulfoksida (DMSO) dan 250 µL campuran xantin-NBT ke dalam tabung eppendorf kemudian 250 µL enzim XOD ditambahkan terakhir. Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan SDS sebanyak 500 µL. Pengukuran aktivitas penghambatan dilakukan dengan menggunakan

spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm dan absorban dicatat sebagai E_{BI} .

Larutan sampel-blanko dibuat dengan memasukkan 12,5 μ l sampel dan 250 μ l campuran xantin-NBT ke dalam tabung eppendorf. Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Kemudian reaksi dihentikan dengan menambahkan larutan SDS sebanyak 500 μ l. Pengukuran aktivitas penghambatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm dan absorban dicatat sebagai E_{S-BI} .

Larutan blanko-blanko dibuat dengan memasukkan 12,5 μ l DMSO dan 250 μ l campuran xantin-NBT ke dalam tabung eppendorf. Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit. Selanjutnya reaksi dihentikan dengan

menambahkan larutan SDS sebanyak 500 μ l. Pengukuran aktivitas penghambatan dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 560 nm dan absorban dicatat sebagai E_{BI-BI} .

Aktivitas enzim Superoksida Dismutase (SOD) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

Aktivitas penghambatan reduksi NBT (%) =

$$\frac{(E_{bl} - E_{blbl}) - (E_s - E_{sbl})}{(E_{bl} - E_{blbl})} \times 100\%$$

dimana :

E_s = hasil serapan cahaya sampel

E_{bl} = hasil serapan cahaya kontrol

E_{sbl} = hasil serapan cahaya sampel blanko

E_{blbl} = hasil serapan cahaya blanko

Tabel 1. Skema Kerja Pengukuran Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (SOD)

	Sampel	Kontrol	Sampel-Blanko	Blanko-Blanko
Sampel (μ L)	12,5	-	12,5	-
DMSO (μ L)	-	12,5	-	12,5
Xantin-NBT (μ L)	250	250	250	250
Enzim XOD (μ L)	250	250	-	-
Inkubasi pada suhu 37°C selama 20 menit				
SDS (μ L)	500	500	500	500
Ukur serapan pada $\lambda = 560$ nm				
Data	E_s	E_{BI}	E_{S-BI}	E_{BI-BI}

HASIL DAN PEMBAHASAN

Untuk mengetahui efek suatu sediaan ekstrak tanaman maka perlu diketahui metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Fungsi metabolit sekunder secara nyata sebenarnya belum ditemukan literatur yang menyatakan dengan jelas fungsinya, beberapa literatur mengatakan sebagai agen perlindungan yang dalam artian mempunyai aktivitas biologik untuk kepentingan per-

indungan dirinya. Sementara metabolit primer digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangannya. Sebagian besar bahan baku obat berasal dari metabolit sekunder tanaman.

Uji fitokimia ekstrak tanaman buah makasar (*Brucea javanica* L. Merr) menunjukkan adanya alkaloid, terpenoid, kuinon, polifenol dan steroid yang tercantum pada tabel 2.

Tabel 2. Data penapisan fitokimia ekstrak kental metanol dan fraksi-fraksi buah makasar (*Brucea javanica* L. Merr)

No.	Sampel	Alkaloid	Polifenol	Steroid	Kuinon	Terpenoid
1	E. Metanol	+	+	+	+	+
2	F. Metanol	+	+	-	-	-
3	F. Etil Asetat	+	+	-	-	+
4	F. Metilen Klorida	-	+	-	+	+
5	F. <i>n</i> -Heksan	-	-	+	+	-

Keberadaan golongan senyawa tersebut dapat memberikan gambaran aktivitas ekstrak/fraksi terhadap suatu spesimen. Suatu senyawa dapat bekerja secara individu maupun bersinergi. Untuk mengetahuinya perlu dilihat dari aktivitas biologiknya.

Aktivitas penghambatan reduksi NBT ekstrak dan fraksi sediaan buah Makasar (*Brucea javanica* L. merr) dicantumkan dalam tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas Penghambatan Reduksi NBT oleh Ekstrak dan Fraksi Sediaan Buah Makasar (*Brucea javanica* L. Merr)

No.	Sampel	Dosis	% Aktivitas Penghambatan Reduksi NBT
1.	Vitamin C	60 mg/kg BB	82,98±6,23
2.	Vitamin E	60 mg/kg BB	78,70±5,34
3.	Ekstrak Metanol	20 mg/kg BB	50,16±3,09
		40 mg/kg BB	66,77±3,67
		80 mg/kg BB	82,75±5,89
4.	Fraksi Metanol	20 mg/kg BB	43,61±2,11
		40 mg/kg BB	54,02±3,12
		80 mg/kg BB	61,02±2,33
5.	Fraksi Etil Asetat	20 mg/kg BB	74,76±4,23
		40 mg/kg BB	75,56±2,89
		80 mg/kg BB	77,25±3,11
6.	Fraksi Metilena Klorida	20 mg/kg BB	34,18±2,11
		40 mg/kg BB	54,38±2,56
		80 mg/kg BB	64,38±3,23
7.	Fraksi <i>n</i> -Heksana	20 mg/kg BB	12,14±1,09
		40 mg/kg BB	27,00±1,87
		80 mg/kg BB	30,54±1,56

Berdasarkan uji penghambatan reduksi NBT terlihat bahwa sifat antioksidan masing-masing ekstrak/fraksi dengan kenaikan dosis menunjukkan peningkatan aktivitas. Aktivitas tertinggi ditunjukkan pada ekstrak metanol dengan dosis 80 mg/kg BB. Hampir semua dosis ekstrak metanol mempunyai aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan fraksi yang lain pada dosis yang sama kecuali pada fraksi etil asetat dosis 20 dan 40 mg/kg BB. Kenyataan ini menunjukkan bahwa senyawa-senyawa antioksidan cenderung bekerja secara sinergis. Bila dibandingkan dengan literatur mengenai senyawa bioaktif yang terkandung dalam buah makasar, biasanya terdapat dalam fraksi-fraksi metilen

klorida, etil asetat dan metanol (Wang *et al.*, 2003; Rahman, *et al.*, 1997; Fukamiya *et al.*, 1992). Senyawa-senyawa quasinoid yang merupakan terpenoid mendominasi pada spesies-spesies tanaman dalam Famili Simarobaceae. Pada penelitian ini fraksi etil asetat mempunyai aktivitas tertinggi diantara fraksi hasil partisi namun masih dibawah ekstrak metanol. Namun bila dibandingkan dengan kontrol positif masih lebih baik kontrol positifnya (vitamin C dan E). Keberadaan kuinon pada fraksi metilen klorida dan *n*-heksan memberikan kontribusi pada aktivitas antioksidan terbukti pada dosis 80 mg/kg BB mampu memberikan aktivitas penghambatan reduksi NBT yang yang

cukup tinggi. Pada fraksi ini dapat diprediksi adanya antioksidan primer.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa persentase penghambatan reduksi NBT oleh ekstrak metanol lebih tinggi dibandingkan fraksi-fraksi hasil partisi. Hal ini menunjukkan senyawa-senyawa antioksidan dalam buah Makasar bekerja secara sinergis. Mekanisme peredaman radikal anion superoksida disebabkan oleh adanya senyawa golongan alkaloid, terpenoid, kuinon, polifenol dan steroid.

DAFTAR PUSTAKA

- Fukamiya, N., Okano, M., Miyamoto, M., Tagahara, K., Lee, K.H., 1992, Antitumor Agents, 127, Bruceoside, A New Cytotoxic Quassinoid Glucoside and Related Compounds from *Brucea javanica*, *J. Nat. Prod.*, 55 (4), 468-475
- Garcia, O.B.; Castillo, J.; Marin, F.R.; Otuno, A. and Del Rio, J.A., 1997, Ses and Properties of Citrus Flavonoids, *J. Agric. Food Chem.*, 45 (12) : 4505-4515.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C and Carrol, E.C., 1992, Free Radicals, Antioxidant, and Human Diseases: Where are you know? *J. Lab Klin Mod*, 598-615.
- Halliwell, 1994, Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease, *J. Biochem* (219).
- Murakami, A.; Yoshimasa, N.; Hajime, O. and Koichi, K., 1997, Chemopreventive Potentials of Edible Plants Thai and Some of Their Active Constituent, Mem. School, B.O.S.T. Kinki University, 1-23.
- Ogata, M.C., Hoshi, M., Shimtohm, K., Urano, S., and Endo T., 1997, Antioxidant Activity of Magnolol, Honokiol and Related Phenolic Compounds, *J. Am. Oil. Chem.*, 7(5): 557-562
- Rahman, S., Fukamiya, N., Okano, M., Tagahara, K. & Lee, K.H., 1997, Antituberculosis Activity of Quassinoids, *Chem. Pharm. Bull.*, 45 (9), 1527-1529
- Wang, F., Cao, Y., Liu, H.Y., Fu, Z.D. & Han, R., (2003), Experimental Studies on the Apoptosis of HL-60 Cells Induced by *Brucea javanica* Oil Emulsion, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 28 (8), 759-762