

**EFEK ANTIOKSIDAN BAGIAN LARUT AIR DARI FRAKSI
ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU BIJI
(*Psidium guajava* L.) PADA KELINCI JANTAN GALUR
New Zealand YANG DIBEBANI GLUKOSA**

SKRIPSI



Oleh :

**PUJI WIJAYANTI
K 100 050 073**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA
SURAKARTA
2010**

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG MASALAH

Stres oksidatif adalah suatu keadaan ketidakseimbangan yang serius antara pembentukan radikal bebas dan sistem antioksidan yang menimbulkan kerusakan jaringan yang potensial (Rosen dkk., 2002). Radikal bebas didefinisikan sebagai sekelompok zat kimia yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Fessenden dan Fessenden, 1994). Peningkatan dari radikal bebas tersebut dapat memicu peroksidasi lipid. Kerusakan akibat peroksidasi lipid dapat menghasilkan metabolit sekunder. Salah satunya adalah *malondialdehyd* (MDA) yang merupakan hasil akhir peroksidasi lipid (Josephy, 1997). Peningkatan radikal bebas dapat terlihat pada perkembangan diabetes tipe I dan tipe II (Rajasekaran dkk., 2005). Sehingga, pemberian antioksidan diperlukan pada pengobatan diabetes, karena obat antidiabetes tidak bekerja memperbaiki sel- β pankreas yang rusak akibat radikal bebas, tetapi menstimulasi pelepasan insulin dari sel- β pankreas (Adnyana dkk., 2004), dan dapat mencegah komplikasi mikrovaskular dan makrovaskular (Soetedjo, 2009). Hal ini diperkuat dengan adanya penelitian Mahdi dkk. (2003) yang menunjukkan adanya peningkatan MDA dan penurunan aktivitas antioksidan pada tikus diabetes yang terinduksi streptozosin.

Hiperglikemik adalah suatu keadaan metabolisme karbohidrat yang ditandai dengan kadar gula darah yang tinggi dan terdapat glukosa dalam urin

(*Glukosuria*) (Widowati, dkk, 1997). Hiperglikemik dapat menyebabkan kereaktifan dari radikal bebas (Latief dkk., 2007). Pada keadaan hiperglikemik, stres oksidatif akan menghambat pengambilan glukosa di sel otot dan sel lemak serta penurunan sekresi insulin oleh sel- β di pankreas. Stres oksidatif secara langsung mempengaruhi dinding vaskular, sehingga berperan penting dalam patofisiologi terjadinya komplikasi diabetes tipe 2 (Soetedjo, 2009).

Antioksidan sintetis seperti *Butil Hidroksi Anisol* (BHA), *Butil Hidroksi Toluena* (BHT) dan propil galat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan (Han dkk., 2004) tetapi dapat menyebabkan karsinogenesis. Menurut hasil penelitian yang dilakukan oleh Haryatmi (2004) menunjukkan bahwa pemberian vitamin E sebagai antioksidan belum mampu menurunkan kadar peroksida darah. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang sumber antioksidan lain yang dapat menangkal radikal bebas. Pencarian antioksidan dari tanaman banyak menarik perhatian karena dapat melindungi tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas. Senyawa antioksidan yang dihasilkan dari tumbuhan seperti vitamin C, vitamin E, karoten, golongan fenol terutama polifenol dan flavonoid diketahui berpotensi mengurangi risiko penyakit degeneratif seperti kanker, diabetes mellitus, penuaan dini dan lain-lain (Prakash, 2001).

Penelitian yang dilakukan oleh (Indriarini, 2009) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas antioksidan lebih besar yang mendekati vitamin E dibandingkan ekstrak air. Penelitian Susilawati (2008),

menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jambu biji dosis 5,407 mg/200 gBB tikus selama 6 hari dapat mencegah peningkatan kadar MDA plasma akibat latihan olahraga. Pada penelitian ini diharapkan adanya aktivitas antioksidan pada bagian larut air dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu terhadap penurunan kadar MDA pada kelinci yang dibebani glukosa.

B. Perumusan Masalah

Bagaimana pengaruh bagian larut air dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap kadar MDA pada kelinci yang dibebani glukosa?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui :

Pengaruh pemberian bagian larut air dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap penurunan kadar MDA pada kelinci jantan galur *New zealand* yang dibebani glukosa.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman daun jambu biji

a. Sistematika tanaman

Tanaman daun jambu biji (*Psidium Guajava* L.) diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Myrtales
Suku : Myrtaceae
Marga : *Psidium*
Jenis : *Psidium guajava* L.

(Van Steenis, 2003)

b. Kandungan kimia dan kegunaan tanaman daun jambu biji

Daun jambu biji mengandung senyawa tanin, fenol, flavonoid, kuinon, dan steroid menunjukkan aktivitas antioksidan (Indriarini, 2004). Penelitian Tachakittirungrod dkk. (2007), menunjukkan bahwa tiga flavonoid aktif dari ekstrak metanol daun jambu biji yang tumbuh di Thailand yaitu kuersetin, kuersetin -3-*O*-glucopiranoside dan morin, mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi.

c. Morfologi Tanaman

Jambu biji tumbuh pada ketinggian 1-1.200 m dpl pada tanah yang gembur maupun liat, jambu biji berbunga sepanjang tahun. Perdu atau pohon kecil, tinggi 2-10 m, percabangan banyak. Batangnya berkayu, keras, kulit batang licin, mengelupas, berwarna coklat kehijauan. Daun tunggal, bertangkai pendek, letak berhadapan, daun muda berambut halus, permukaan atas daun tua licin. Helaiian daun berbentuk bulat telur agak jorong, ujung tumpul, pangkal membulat, tepi agak melekok ke atas, pertulangan menyirip, panjang 6-14 cm, lebar 3-6 cm,

berwarna hijau. Bunga tunggal, bertangkai, keluar dari ketiak daun, berkumpul 1-3 bunga, berwarna putih. Buahnya berbentuk bulat, berwarna hijau sampai hijau kekuningan (Dalimartha, 2003).

2. Metode Ekstraksi

Ada beberapa metode ekstraksi yang dipakai untuk penyarian yaitu cara dingin dan cara panas. Cara dingin yaitu maserasi, perkolasi, sedangkan cara panas yaitu refluksi, digesti, infusa dan dekokta (Anonim, 1986).

a. Maserasi

Penyarian adalah peristiwa pemisahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel ditarik oleh larutan penyari sehingga zat larut dalam pelarut penyari (Anonim, 1986). Penyarian yang digunakan adalah maserasi yang umumnya dilakukan dengan merendam simplisia dengan derajat halus yang sesuai kedalam suatu bejana kemudian dituang 75 bagian pelarut ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindungi dari cahaya sambil berulang-ulang dikocok kemudian diserakai hingga diperoleh seluruh sari sebanyak mungkin bagian (Anonim, 1986).

b. Cairan penyari

Pemilihan pelarut tidak hanya tergantung pada kandungan zat aktif yang diselidiki, tapi juga tergantung tempat terdapatnya atau substansi apa saja yang dikandung didalamnya. Pelarut polar yang biasa digunakan untuk menyari glikosida flavonoid adalah air, etanol, metanol, butanol, aseton, dimetil sulfoksida dan dimetil formamid. Aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavonon dan flavon serta flavonol akan lebih larut dalam pelarut yang kurang polar seperti eter dan kloroform (Ahmad, 1990). Air merupakan penyari polar yang murah, mudah

diperoleh, stabil, tidak mudah menguap, tidak mudah terbakar dan tidak beracun. Kerugian dalam penggunaan air sebagai penyari yaitu tidak selektif, untuk pengeringan diperlukan waktu yang lama, sari mudah ditumbuhi kapang dan kuman, serta cepat rusak. (Anonim,1986).

3. Diabetes Melitus

a. Patofisiologi Diabetes mellitus

Diabetes mellitus adalah suatu penyakit metabolisme karbohidrat yang ditandai dengan kadar gula darah yang tinggi (hiperglikemi) dan adanya glukosa dalam urin (*Glukosuria*) (Widowati dkk, 1997).

Klasifikasi *Diabetes Mellitus* berdasarkan etiologinya adalah sebagai berikut :

Tipe-1 Diabetes mellitus yang tergantung insulin (DMTI). Penderita tidak dapat memproduksi insulin akibat pankreas kehilangan kemampuan untuk memproduksi insulin. Penderita biasanya tergantung dengan insulin untuk mencegah ketosis dan memelihara kelangsungan hidup karena penderita tersebut menderita *insulinopenia* dimana penderita kekurangan insulin.

Tipe-2 Diabetes mellitus yang tidak tergantung insulin. Pada Diabetes mellitus tipe ini pankreas masih berfungsi tetapi tubuh kehilangan kemampuan untuk memanfaatkan insulin secara efektif (Widowati, dkk, 1997).

b. Hubungan antara Radikal Bebas dengan Diabetes Mellitus

Peningkatan kadar glukosa dalam darah disebabkan oleh kerusakan pankreas sehingga tidak dapat menghasilkan insulin. Kerusakan pankreas ini dapat disebabkan oleh senyawa radikal bebas yang merusak sel-sel pada pankreas sehingga tidak dapat berfungsi (Studiawan, 2004).

Beberapa jalur mekanisme peningkatan stres oksidatif akibat kadar gula yang meningkat yaitu jalur poliol pada saraf perifer, jalur peningkatan produksi *Advanced Glycation End products* (AGEs), jalur aktivasi protein kinase C (*PKC*), jalur *hexosamine pathway flux* akibat modifikasi berlebihan dari protein oleh *N*-acetylglucosamine (Adi, 2009), autooksidasi glukosa pada diabetes melitus (Setiawan dan Suhartono, 2005), dan fosforilasi oksidatif (Robertson, 2004).

1). Jalur poliol pada saraf perifer

Jalur poliol – sorbitol pada hiperglikemia dapat mereduksi glukosa dan menghasilkan sorbitol dengan mediasi aldosa reduktase. Kemudian sorbitol dikonversi menjadi fruktosa oleh sorbitol dehidrogenase. Hal ini dapat meningkatkan produksi ROS (*reactive oxygen species*) (Chung dkk., 2003).

2). Jalur AGEs

Hiperglikemia meningkatkan produksi AGE prekursor, yang mengakibatkan kerusakan sel melalui 3 mekanisme. Pertama dengan cara modifikasi protein intraseluler termasuk protein yang berperan dalam regulasi gen transkripsi. Kedua, AGE prekursor dapat berdifusi keluar dari sel, memodifikasi molekul matriks ekstraseluler yang berdekatan dengan sel dan mengacaukan *signaling* antara matriks dengan sel, menyebabkan disfungsi dari sel tersebut. Ketiga, AGE prekursor yang berdifusi keluar sel tersebut juga memodifikasi protein plasma yang kemudian berikatan dan mengaktifkan reseptor AGE dengan akibat pembentukan *inflammatory cytokines* dan *growth factors* yang menyebabkan kerusakan vaskuler (Brownlee, 2005).

3). Jalur aktivasi PKC

Hiperglikemia akan meningkatkan *diacylglycerol* (DAG) yang merupakan aktivating kofaktor penting untuk protein isoform PKC $-\beta$, $-\delta$, dan $-\alpha$. Apabila PKC diaktifkan oleh hiperglikemia intraseluler, akan menyebabkan beragam efek terhadap ekspresi gen dengan segala manifestasi klinis (Brownlee, 2005).

4). Jalur Hexosamine

Pada kadar glukosa tinggi, fruktosa 6-fosfat melalui glutamine: fruktosa 6-fosfat aminotransferase (GFAT) akan membentuk glukosamin 6-fosfat (Nishimura, 1998).

5). Autooksidasi glukosa

Proses autooksidasi glukosa dikatalisis oleh senyawa logam dalam jumlah kecil seperti besi dan seng. Hasil katalisis tersebut adalah senyawa oksigen reaktif. Autooksidasi glukosa terjadi pada fase I proses glikasi nonenzimatik pada protein yang secara alamiah masih bersifat reversibel. Akibat yang ditimbulkan berupa peningkatan aktivitas radikal superoksida serta kerusakan enzim superoksida dismutase (Soesilowati, 2003).

6). Fosforilasi oksidatif

Peningkatan kadar glukosa dapat meningkatkan proton mitokondria karena terlalu banyak donor elektron melalui siklus asam trikarboksilat. Hal ini dapat meningkatkan produksi superoksida mitokondria dan kegagalan pengeluaran insulin dari sel β pankreas (Robertson, 2004).

Pada penderita diabetes melitus, stres oksidatif akan menghambat pengambilan glukosa di sel otot dan sel lemak serta penurunan sekresi insulin oleh

sel- β di pankreas. Stres oksidatif secara langsung mempengaruhi dinding vaskular, sehingga berperan penting dalam patofisiologi terjadinya komplikasi diabetes tipe 2 (Soetedjo, 2009).

Peningkatan radikal bebas secara umum menyebabkan gangguan fungsi sel dan kerusakan oksidatif pada membran. Pada kondisi tertentu antioksidan mempertahankan sistem perlindungan tubuh melalui efek penghambat pembentukan radikal bebas. Efisiensi mekanisme pertahanan tersebut mengalami perubahan pada diabetes mellitus. Penangkapan radikal bebas yang tidak efektif dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Rajasekaran dkk., 2005; Kaleem dkk., 2006).

4. Radikal bebas

Radikal bebas merupakan sekelompok zat kimia yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Fessenden dan Fessenden, 1994). Senyawa radikal bebas timbul akibat berbagai proses kimia kompleks dalam tubuh, metabolisme oksidatif mitokondria, atau ketika tubuh terpapar polusi lingkungan (Reynertson, 2007).

Radikal bebas bersifat destruktif, sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan makromolekul sel, seperti: protein, lipid, karbohidrat, atau DNA (Langseth, 1995). Reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya suatu penyakit, yaitu antara lain:

a. Kerusakan DNA pada inti sel

Senyawa radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA dengan mengoksidasi DNA (Reynertson, 2007). Jika sel yang mengandung

DNA rusak (*damaged DNA*) membelah sebelum DNA tersebut diperbaiki, akan mengakibatkan perubahan genetik secara permanen, hal tersebut merupakan langkah pertama dalam karsinogenesis (Langseth, 1995). Oksidasi DNA oleh senyawa radikal bebas dapat menginisiasi terjadinya kanker (Reynertson, 2007).

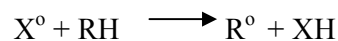
b. Kerusakan protein

Perubahan LDL (*low density lipoprotein*) menjadi bentuk LDL teroksidasi yang diperantarai oleh radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan dinding arteri dan kerusakan bagian arteri lainnya (Langseth, 2005). Meningkatnya kadar *LDL* oleh oksigen reaktif dapat merusak dinding arteri yang menyebabkan aterosklerosis (Langseth, 1995).

c. Peroksida lipid

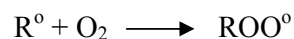
Peroksidasi lipid sebagai akibat dari stress oksidatif yang terjadi melalui tiga tahap merupakan reaksi berantai yang terus menghasilkan pasokan radikal bebas yang dapat merusak jaringan dan dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti kanker penyakit inflamasi, penuaan dan lain-lain. Peroksidasi lipid terjadi melalui tiga tahap reaksi berantai, yaitu :

1). Inisiasi



Pada tahap ini dengan adanya oksigen bebas akan terjadi pengambilan atom H dari *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) yang terdapat pada membrane sel sehingga menyebabkan kerusakan pada sel.

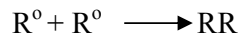
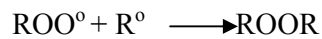
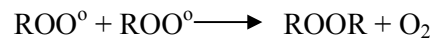
2). Propagasi





Hasil dari reaksi ini akan menjadi inisiator baru untuk bereaksi dengan PUFA yang lain sehingga menghasilkan produk radikal baru.

3). Terminasi



Tahap ini mengkombinasikan dua radikal menjadi suatu produk non radikal (Murray dkk., 2000).

5. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau suatu zat yang dapat menetralkan atau menangkap radikal bebas (Murray dkk., 2000) dan melindungi jaringan biologis dari kerusakan akibat radikal bebas. Antioksidan berperan dalam pengobatan diabetes mellitus untuk memperbaiki sel β pankreas yang rusak sehingga dapat meningkatkan sekresi insulin (Chauhan dkk., 2008).

Atas dasar mekanisme kerjanya antioksidan dapat dibedakan menjadi 3 yaitu :

a. Antioksidan primer, antioksidan ini bekerja dengan cara mencegah pembentukan oksigen radikal baru, contohnya: superoksida dismutase (SOD), O_2 menjadi hidrogen peroksida, Glutation peroksidase (GTX) mengubah hidrogen peroksida dan lipid peroksida menjadi molekul yang kurang berbahaya sebelum mereka membentuk radikal bebas.

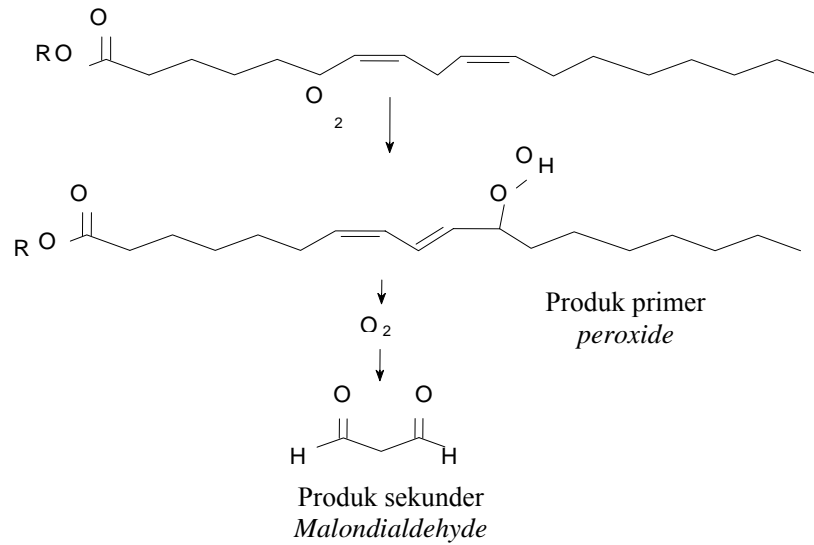
b. Antioksidan sekunder, antioksidan ini dapat menangkap radikal dan mencegah terjadinya reaksi berantai contohnya: Vitamin E (*Alfa tokoferol*) Vitamin C (asam askorbat), beta karoten, kurkuminoid, asam urat, bilirubin dan albumin.

c. Antioksidan tersier, antioksidan ini dapat memperbaiki kerusakan biomolekuler yang disebabkan oleh radikal bebas, contohnya adalah enzim-enzim metionin sulfoksida reduktase yang dapat memperbaiki DNA dalam sel inti. (Kumalaningsih, 2006).

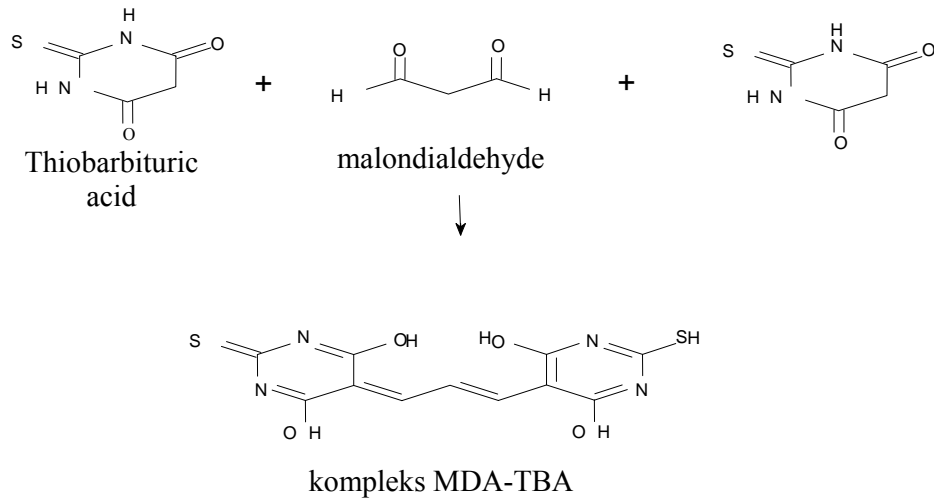
6. Malondialdehid (MDA)

MDA terbentuk dari peroksidasi lipid (Lipid peroxidation) pada membran sel yaitu reaksi radikal bebas (radikal hidroksi) dengan *Polyl Unsaturated Fatty Acid* (PUFA). Reaksi tersebut terjadi secara berantai, akibat akhir dari reaksi rantai tersebut akan terbentuk hidrogen peroksida. Hidrogen peroksida tersebut dapat menyebabkan dekomposisi beberapa produk aldehid yang bersifat toksik terhadap sel dan berbeda panjang rantainya, antara lain MDA, yang merupakan salah satu aldehid utama yang terbentuk (Edyson, 2003) (Gambar 1).

Pengukuran kinetika peroksidasi lipid secara *in vitro* dapat dilakukan dengan mengukur berapa banyak oksigen yang dibutuhkan. Ada beberapa metode yang dapat digunakan, salah satunya TBA (*Thiobarbituric acid*) *reactivity test*, yang dapat dilakukan baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Tes ini didasarkan pada reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam (Gambar 2).



Gambar 1. Mekanisme Peroksidasi PUFA menjadi MDA



Gambar 2. Reaksi kondensasi antara satu molekul MDA dengan dua molekul TBA pada kondisi asam.

7. Vitamin E

Vitamin E mengandung tidak kurang dari 96,0 % ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$). Kelarutan praktis tidak larut dalam air, larut dalam etanol. Vitamin E biasanya digunakan sebagai antioksidan dan penambah gizi (Anonim, 1979).

Penelitian oleh Indriarini, (2009), menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun jambu biji memiliki aktivitas antioksidan lebih besar, mendekati vitamin E dari pada ekstrak air. Penelitian yang dilakukan oleh Tachakittirungrod^a dkk. (2007), menunjukkan bahwa tiga flavonoid aktif dari ekstrak metanol daun jambu biji yang tumbuh di Thailand yaitu kuersetin, kuersetin -3-*O*-glucopiranoside dan morin, memiliki aktivitas sebagai agen penangkap radikal bebas dengan IC₅₀ 1,20 ± 0,02, 3,58 ± 0,05 dan 5,41 ± 0,20 µg/ml. Penelitian Susilawati (2008), menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun jambu biji dosis 5,407 mg/200 gBB tikus selama 6 hari terdapat efek mencegah peningkatan kadar MDA plasma akibat latihan olahraga.

F. Hipotesis

1. Pembebanan glukosa dapat meningkatkan kadar MDA.
2. Pemberian bagian larut air dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) mempunyai aktivitas dapat menurunkan kadar MDA pada kelinci jantan galur *New zealand* yang dibebani glukosa.