

Uji aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan perannya sebagai inhibitor *advanced glycation end products* (AGEs) akibat reaksi glikosilasi

Eko Suhartono^{1,2}, Bambang Setiawan^{1,2}, Edyson³, Ramlah⁴

¹Bagian Kimia Kedokteran

²Kelompok Studi Radikal Bebas dan Pemanfaatan Bahan Alam

³Bagian Biokimia

⁴Mahasiswa S1 Program Studi Pendidikan Dokter,

Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat, Banjarbaru, Kalimantan Selatan

ABSTRACT

Eko Suhartono, Bambang Setiawan, Edyson, Ramlah – *Antioxidant activity of mengkudu fruit juice (Morinda citrifolia) and the role as an inhibitor of advanced glycation end products (AGEs) by glycosilation reaction.*

Background: Mengkudu is a traditional plant with active compound that has antioxidant activity. Diabetes mellitus complication has causative link with AGEs formation that involves free radical.

Objective: To know antioxidant activity of mengkudu and the role to inhibit AGEs formation.

Methods: This experiment used pre and post test control group design. Antioxidant activity was determined by reacting the mengkudu juice with 2,4 dinitrophenylhydrazin (DNPH) and analyzed with spectrophotometer $\lambda = 390$ nm. AGEs absorbancy was measured every 48 hours until 20 days with spectrophotometer $\lambda = 340$ nm. Dicarbonyl level was determined with DNPH method that was developed by Uchida and modified by Sadikin.

Result: Antioxidant activity of 0.25 g/ml mengkudu juice (*Morinda citrifolia*) was $125.46 \pm 27.79\%$. Beside that, mengkudu juice can inhibit advanced glycation end products (AGEs) formation.

Conclusion: Mengkudu juice can decrease AGEs formation and has antioxidant activity.

Key words: antioxidant – mengkudu juice – AGEs – glycosilation

ABSTRAK

Eko Suhartono, Bambang Setiawan, Edyson, Ramlah - *Uji aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (Morinda citrifolia) dan perannya sebagai inhibitor advanced glycation end products (AGEs) akibat reaksi glikosilasi.*

Latar Belakang: Mengkudu merupakan tanaman obat tradisional dengan bahan aktif yang bersifat antioksidan. Komplikasi diabetes mellitus terkait dengan pembentukan AGEs yang melibatkan radikal bebas.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan mengkudu dan perannya sebagai penghambat pembentukan AGEs.

Bahan dan Cara: Penelitian bersifat *pre and post test control group design*. Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan jus mengkudu dengan 2,4 dinitrophenylhydrazin (DNPH) dan dianalisis dengan spektrofotometer $\lambda = 390$ nm. Senyawa AGEs diukur absorbansinya setiap 48 jam selama 20 hari dengan spektrofotometri $\lambda = 340$ nm. Kadar senyawa dikarbonil ditentukan dengan metoda DNPH yang dikembangkan Uchida dan dimodifikasi oleh Sadikin.

Hasil: Aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) konsentrasi 0,25 g/ml adalah $125,46 \pm 27,79\%$. Selain itu, jus buah mengkudu dapat menghambat pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs)

Simpulan: Jus mengkudu mampu menurunkan laju pembentukan AGEs dan berperan sebagai senyawa antioksidan.

PENGANTAR

Mengkudu (*Morinda citrifolia*) merupakan salah satu jenis tanaman yang sering digunakan sebagai obat.^{1,2} Buah mengkudu dimanfaatkan untuk mengobati gangguan fungsi ginjal, hepatitis kronis, diabetes, sistem pencernaan, sistem kardiovaskular, dan lain-lain^{3,4}. Tanaman mengkudu yang berasal dari kepulauan Hawaii dan Tahiti buahnya mengandung bahan kimia aktif, antara lain terpenoid, skolepektin, xeronin, dan antraquinon.^{5,6} Di samping itu, mengkudu juga mengandung protein, mineral, dan vitamin C yang dapat berperan sebagai antioksidan⁷.

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menghambat atau mencegah reaksi oksidasi. Ada 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).

AGEs merupakan senyawa hasil reaksi Maillard yang bersifat ireversibel. Reaksi ini dicirikan dengan terjadinya pencoklatan 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. Pada reaksi yang bekerja secara nonenzimatik 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

Pada penelitian terdahulu disebutkan bahwa akumulasi AGEs di berbagai jaringan dapat meningkatkan stress oksidatif.¹⁰ Hasil penelitian Ueno¹¹ juga mengungkap bahwa akumulasi AGEs akibat diabetes secara umum mempercepat terjadinya aterosklerosis, nefropati, neuropati, retinopati, serta katarak.

Pada penelitian Voziyan¹² diungkapkan 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 antara lain daun tapak dara, pasak bumi, dan daun pare juga dapat menghambat pembentukan senyawa dikarbonil hasil reaksi glikosilasi.¹³⁻¹⁵ Penelitian yang berkaitan dengan penghambatan AGEs oleh tanaman obat belum banyak dilakukan. Oleh karena itu pada penelitian ini ingin dikaji aktivitas antioksidan jus mengkudu 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 ini dilakukan di Laboratorium Kimia/Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Lambung Mangkurat Banjarbaru pada bulan April-Juni 2004.

Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang diambil dari kebun di daerah Martapura 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/l, dan etanol-etil asetat. Keseluruhan bahan kimia yang digunakan merupakan bahan analisis murni (p.a).

Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi gelas (Pyrex®), pH-meter (Cyberscan®), sentrifuge (Centurion®), vortex (VM-300®), oven (Heto®), dan neraca analitik (Gibertini E42S-B). Di samping itu digunakan pula spektrofotometer (Biosystems® BTS-305).

Cara Kerja Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *pre and post test control group design* dengan *follow up post test* dilakukan setiap 48 jam. Penelitian ini akan mengukur aktivitas antioksidan jus mengkudu, pembentukan AGEs, dan senyawa dikarbonil akibat reaksi glikosilasi.

Cara penelitian

1. Persiapan sampel

Sampel jus buah mengkudu dibuat berdasarkan kebiasaan yang dilakukan oleh masyarakat di Kalimantan Selatan. Caranya, buah mengkudu dibersihkan, kemudian dipotong kecil-kecil. Setelah itu diblender sampai halus. Kemudian diambil ± 25 gram dan dilarutkan dalam 100 ml air. Konsentrasi jus mengkudu ini adalah 0,25 g/ml.

2. Uji Potensi Antioksidan

Jus mengkudu sebanyak 0,01 ml dan *bovine serum albumin* (BSA) 30% dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi reagen reaksi Fenton. Radikal bebas yang terbentuk dari reaksi tersebut kemudian bereaksi dengan 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.¹⁶ 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 ($E_1 - E_0$)

3. Pengukuran absorbansi senyawa AGEs dan kadar senyawa dikarbonil.

Untuk mengukur absorbansi AGEs dan kadar senyawa dikarbonil, disiapkan 3 larutan: 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+jus buah mengkudu. 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 Uchida¹⁷ dan dimodifikasi oleh Sadikin¹⁶

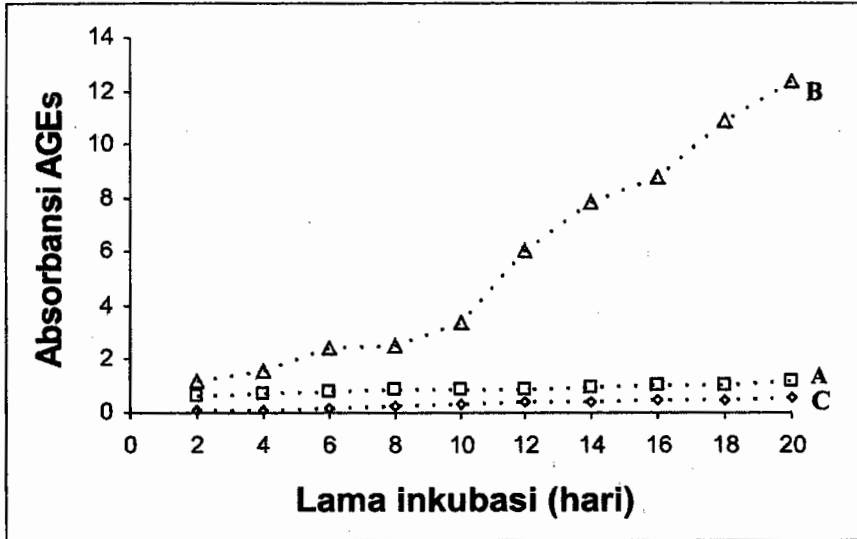
HASIL DAN PEMBAHASAN

Rata-rata hasil uji aktivitas antioksidan jus mengkudu adalah sebesar $125,46 \pm 27,79\%$. Aktivitas antioksidan ini menunjukkan kemampuan jus mengkudu menangkap radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi Fenton. Radikal hidroksil tersebut merupakan hasil reduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} , yang selanjutnya bereaksi dengan H_2O_2 sehingga terbentuk radikal hidroksil.

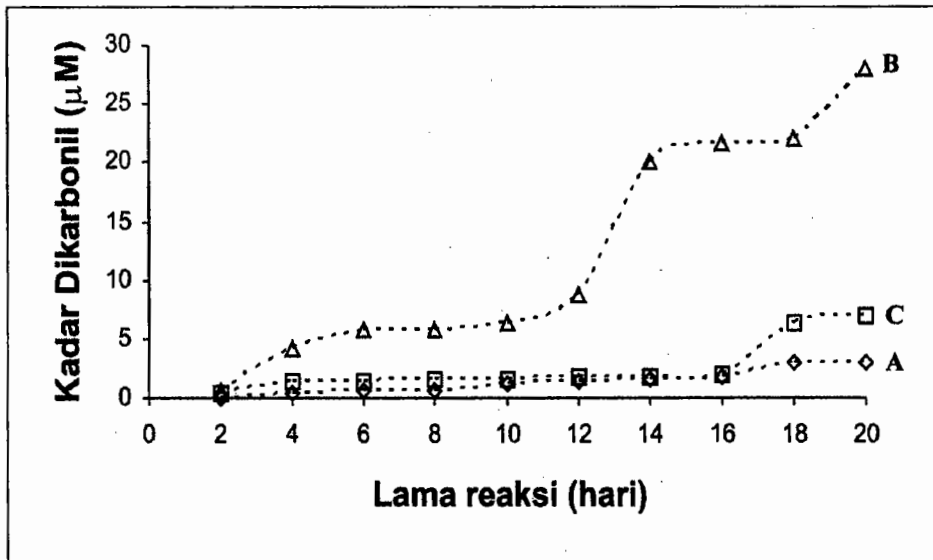
Aktivitas antioksidan yang dimiliki oleh jus mengkudu berperan dalam menghambat laju pembentukan AGEs. Hasil penelitian ini memperlihatkan adanya perbedaan laju pembentukan AGEs tanpa pemberian jus mengkudu yang berlangsung sangat cepat. Akan tetapi, setelah pemberian jus mengkudu ternyata pembentukan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

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa laju pembentukan senyawa dikarbonil tanpa dan dengan pemberian jus mengkudu. Hal ini dapat dilihat pada GAMBAR 2.

AGEs adalah molekul yang dihasilkan dari reaksi glikosilasi, yakni reaksi antara gugus aldehid dari glukosa dengan gugus amina dari protein. Pembentukan AGEs secara umum dapat dijelaskan pada GAMBAR 3. Mekanisme pembentukan AGEs yang sangat kompleks dan rumit, secara sederhana dapat dijelaskan sebagai berikut: glukosa merupakan monosakarida yang mempunyai gugus aldehid pada atom karbon 1 dan gugus hidroksil pada atom karbon 4 dan 5 (seperti juga pada karbon 2, 3, dan 6). Di dalam larutan air glukosa dapat bereaksi secara intramolekul untuk menghasilkan hemiasetal siklik. Bentuk hemiasetal siklik tersebut mudah dioksidasi



GAMBAR 1. Laju pembentukan AGEs berdasarkan nilai absorbansinya. Pembentukan AGEs pada larutan B, yakni larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM (—Δ—) lebih besar daripada larutan A (—◇—) dan larutan C, yaitu larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM+ jus mengkudu (—□—)



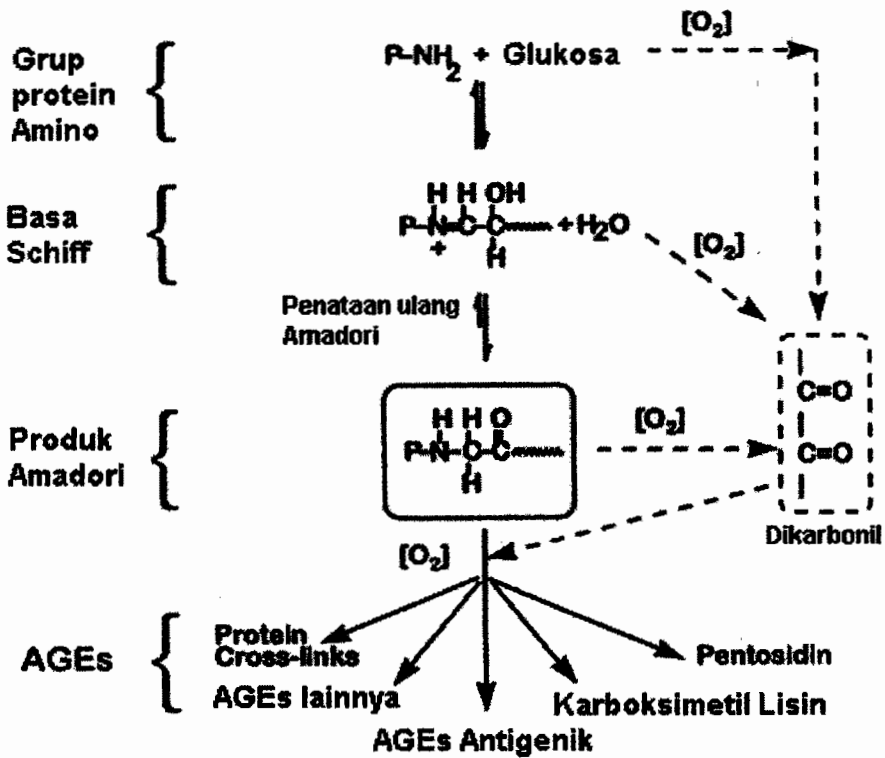
GAMBAR 2. Laju pembentukan senyawa dikarbonil. Pembentukan senyawa dikarbonil pada larutan B, yakni larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM (—Δ—) lebih besar daripada larutan kontrol (—◇—) dan larutan C, yaitu larutan yang berisi BSA30%+glukosa 500 mM+ jus mengkudu (—□—)

karena glukosa berada dalam keseimbangan dengan bentuk aldehyd rantai terbukanya, yakni 64,34% β-D-glukosa, 35,64% α-D-glukosa, dan 0,02% bentuk aldehyd dari D-glukosa.¹⁸ Gugus aldehyd pada rantai lurus glukosa tersebut kemudian bereaksi dengan gugus amino (-NH₂) protein. Hasil reaksi awal dikenal sebagai basa schiff, yang secara spontan mengalami penataan ulang menjadi produk Amadori.¹⁹

Akibat efek tautomeri, yakni perubahan posisi gugus karbonil dari aldehyd menjadi keton atau sebaliknya, akan terbentuk senyawa enol, yaitu 2,3-enediol.¹⁸ Senyawa 2,3-enediol ini berada dalam bentuk keseimbangan terhadap produk Amadori. Selanjutnya, dengan adanya katalis logam dan molekul O₂, senyawa 2,3-enediol akan teroksidasi menjadi senyawa α,β-dikarbonil yang reaktif.^{20,21} Selanjutnya, senyawa

α,β -dikarbonil yang reaktif tersebut dapat berikatan dengan asam-asam amino lisin, histidin, arginin, dan

lain-lain. Ikatan tersebut menghasilkan sekelompok senyawa yang disebut dengan AGEs.



GAMBAR 3. Mekanisme pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil

Tampak pada 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 buah mengkudu.

Jus buah mengkudu dapat menghambat laju pembentukan AGEs dan senyawa dikarbonil diduga karena kandungan kimia yang dimilikinya, antara lain vitamin C. Vitamin C mempunyai kelarutan yang tinggi di dalam air dan efisien dalam menghambat pembentukan radikal superoksida ($\bullet\text{O}_2$), radikal hidroksil ($\bullet\text{OH}$), radikal peroksil ($\text{ROO}\bullet$), oksigen singlet ($^1\text{O}_2$) dan hidrogen peroksida (H_2O_2).²² Secara *in vivo*, pemberian vitamin C dapat mem-

bantu penderita diabetes mencegah terjadinya komplikasi jangka panjang dengan cara menurunkan kadar sorbitol dan menurunkan glikosilasi protein.²³

Hasil penelitian ini sesuai dengan Voziyan,²⁴ yaitu AGEs dapat dihambat oleh suatu inhibitor yang bersifat sebagai antioksidan dan *chelating agent*. Perbedaannya, Voziyan²⁴ menggunakan piridoksamin dan derivatnya, akan tetapi penelitian ini menggunakan jus mengkudu.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan jus buah mengkudu (*Morinda citrifolia*) konsentrasi 0,25 gr/ml adalah $125,46 \pm 27,79\%$. Selain itu, jus buah mengkudu dapat menghambat pembentukan *advanced glycation end products* (AGEs)

KEPUSTAKAAN

1. Bangun AP, Sarwono B. Khasiat dan manfaat mengkudu. Jakarta: Agromedia Pustaka, 2002.
2. Anonymous. Tanaman obat Indonesia. www.iptek.net.id 2002.
3. Utami P, Tanaman obat untuk mengatasi diabetes mellitus. Jakarta: Agromedia Pustaka, 2002.
4. Singh AP. A treatise on phytochemistry. Emedia Science, 2002.
5. Anonymous. Mengkudu (*Morinda citrifolia*). Pusat Data dan Informasi PERSI.2003. www.pdpersi.co.id
6. Wiryowidagdo S, Sitanggang M. Tanaman obat untuk penyakit jantung, darah tinggi, dan kolesterol. Jakarta: PT Agromedia Pustaka; 2002.
7. Anonymous. History and tradition of morinda citrifolia. Kemaskini.2000. www.google.com
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. Voziyan PA, Khalifah R, Thibaudeau C, Yildiz A, Jacob J, Serianni AS, et al. Modification of protein in vitro by physiological levels of glucose. *J Biol Chem*. 2003; 278; 47:4616-24.
13. Budianto R, Qamariah N, Suhartono E. Potensi infus 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 infus 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. 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.
17. Uchida 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*. 1998; 95:4882-7.
18. Fessenden RJ, Fessenden JS. Kimia organik, edisi ke 3 Alih bahasa: A. Hadyana Pudjattmaka, Penerbit Erlangga 1986, Jakarta
19. Lee C, Yim MB, Chock PB, Yim HS, Kang SO. Oxidation-reduction properties of methylglyoxal-modified protein in relation to free radical generation. *J Biol Chem* 1998; 273:39.
20. Benov L, Fridovich I. Superoxide dependence of the toxicity of short chain sugars. *J.Biol.Chem* 1998;273: 25741-4.
21. Matsumoto AO, Fridovich I. The role of a,b-dicarbonyl compounds in the toxicity of short chain sugars. *J.Biol.Chem* 2000; 275: 34853-7.
22. Suhartono E, Fujiati, Panghiyangani R. Pengaruh vitamin C terhadap jumlah eritrosit dan kadar hemoglobin pada tikus wistar Spraque Dawley yang dipajan sinar ultraviolet. I. *Ked YARSI* 2004;12(4):42-5
23. Subarnas A. Komponen aktif antioksidan bahan alam. Disampaikan pada Seminar nasional dan Lokakarya Pemahaman Konsep Radikal Bebas dan peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kesehatan menuju Indonesia Sehat 2010, Bandung, 29-30 September 2001.
24. Voziyan PA, Khalifah R, Thibaudeau, 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.