

Uji Aktivitas *Chelating* Logam Ion Besi Minuman Gambir Kombucha Lokal Bali Secara *In Vitro* yang Berpotensi Untuk Pengobatan Alzheimer

Satiawan, I. P. J.¹, Widjaja I.N.K.¹, Leliqia N. P. E.¹

¹Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Korespondensi: I Putu Jeffry Satiawan

Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana

Jalam Kampus Unud-Jimbaran, Jimbaran-Bali, Indonesia 80364 Telp/Fax: 703837

Email: iptjeffrysatiawan@gmail.com

ABSTRAK

Alzheimer adalah penyakit progresif dan neurodegeneratif fatal yang secara klinik ditandai dengan adanya penurunan kemampuan kognitif dan daya ingat. Salah satu terapi yang disarankan untuk penyakit ini adalah penggunaan kombinasi antioksidan dan chelating logam ion besi. Minuman gambir kombucha lokal Bali telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan. Namun kemampuan chelating logam ion besi dari minuman tersebut belum dibuktikan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas chelating logam ion besi dari minuman gambir kombucha lokal Bali menggunakan metode Ferrous Ion Chelating (FIC) dan aktivitasnya dibandingkan dengan standar (+)-katekin dan larutan produk gambir.

Metode FIC mengukur kemampuan suatu senyawa untuk bersaing dengan ferrozine dalam mengkelat logam ion besi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa minuman gambir kombucha lokal Bali memiliki aktivitas chelating logam ion besi (IC₅₀ 37, 85 mg/mL) lebih lemah dibandingkan larutan produk gambir (IC₅₀ 7,76 mg/mL) dan standar (+)-katekin (IC₅₀ 3,35 mg/mL) (p<0,05).

Kata Kunci: Kombucha, gambir, (+)-katekin dan *Ferrous Ion Chelating* (FIC)

1. PENDAHULUAN

Alzheimer adalah penyakit progresif dan neurodegeneratif fatal yang secara klinik ditandai dengan adanya penurunan kemampuan kognitif dan daya ingat. Salah satu patogenesis alzheimer adalah adanya akumulasi ion logam seperti besi (Fe²⁺) yang berlebih di otak. Ion ini dapat meningkatkan agregasi β *Amyloid peptide* yang bersifat neurotoksik dan interaksi keduanya dapat menghasilkan H₂O₂ serta melalui reaksi *Fenton* dan *Haber Weiss* dihasilkan super radikal OH⁻ (Smith *et al.*, 2007). Jumlah radikal bebas atau ROS (*Reactive Oxygen Species*) yang berlebih di otak dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel akibat stres oksidatif.

Salah satu terapi yang disarankan untuk penyakit alzheimer adalah penggunaan kombinasi antioksidan dan *chelating* logam ion besi (*free radical scavenging*) (Smith *et al.*, 2007). Salah satu bahan alam yang terbukti memiliki aktivitas antioksidan (*free radical scavenging*) adalah gambir (*Uncaria gambir Roxb*) dan diduga yang bertanggung jawab

terhadap aktivitas tersebut adalah senyawa katekin jenis (+)-katekin yang merupakan kandungan utama dari produk gambir (Taniguchi *et al.*, 2007).

Pengembangan produk gambir menjadi minuman kombucha menunjukkan bahwa secara *in vitro*, minuman gambir kombucha lokal Bali yang difermentasi selama 3 hari memberikan aktivitas antioksidan (*free radical scavenging*) yang optimal (Chanjaya, 2014). Penelitian secara *in vivo* menunjukkan minuman tersebut juga terbukti mampu meningkatkan daya ingat mencit yang diinduksi dengan *Electro convulsive shock* (Moeliono dkk., 2014). Namun sampai saat ini, uji aktivitas *chelating* logam ion besi dari minuman gambir kombucha lokal Bali belum pernah dilakukan penelitiannya.

Tujuan penelitian ini adalah menguji aktivitas *chelating* logam ion besi dari minuman gambir kombucha lokal Bali secara *in vitro* dengan menggunakan metode FIC (*Ferrous Ion Chelating*). Bila terbukti

memiliki aktivitas sebagai *chelating* logam ion besi maka dalam pengobatan alzheimer minuman gambir kombucha lokal Bali tidak saja bekerja melalui mekanisme penangkapan radikal bebas (ROS) akibat stres oksidatif di otak, namun bisa mencegah agregasi β *Amyloid peptide* dan terbentuknya ROS. Melalui penelitian ini juga akan dibandingkan aktivitas *chelating* logam ion besi antara minuman gambir kombucha lokal Bali dengan larutan produk gambir dan standar (+)-katekin.

2. BAHAN DAN METODE

2.1 Pembuatan Minuman Gambir Kombucha Lokal Bali

Sejumlah 12 gram serbuk produk gambir ditambahkan secara perlahan ke dalam 200 mL *Sterile Water For Irrigation*. Kemudian dipanaskan pada suhu 65°C hingga 5 menit dan disaring hingga diperoleh filtrat. Filtrat ditambahkan gula 10% b/v, didinginkan hingga suhu kamar, selanjutnya ditambahkan starter kombucha sebanyak 3% b/v, ditutup dengan kain bersih, dan diinkubasi pada suhu 24-27°C di tempat yang terlindung dari cahaya serta guncangan selama 3 hari (Moeliono dkk., 2014).

2.2 Penyiapan Larutan Produk Gambir

Sejumlah 12 gram serbuk produk gambir dimasukkan dalam beker glass, dilarutkan dengan 200 mL *Sterile Water For Irrigation* (pH 2,8) disertai dengan pengadukan dalam *ultrasonic bath* selama 90 menit pada suhu 65°C dan disaring (Jaya, dkk., 2011).

2.3 Penyiapan Standar (+)-Katekin

Standar (+)-katekin dikeringkan di dalam oven pada temperatur 105°C selama 3 jam. Kemudian ditimbang secara seksama 10 mg standar (+)-katekin, dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan *Sterile Water For Irrigation* (pH 2,8) secukupnya dan dimasukan dalam *ultrasonic bath* selama 90 menit pada suhu 65°C, kemudian digenapkan volumenya menggunakan *Sterile Water For Irrigation* (pH 2,8) sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen (Jaya, 2011).

2.4 Penyiapan Na₂EDTA (Kontrol Positif)

Ditimbang secara seksama 10 mg Na₂EDTA, dimasukan ke dalam labu ukur 10 mL, ditambahkan *Sterile Water For Irrigation* (pH 2,8) sedikit demi sedikit sambil dikocok perlahan sampai larut kemudian digenapkan volumenya menggunakan *Sterile Water For*

Irrigation (pH 2,8) sampai tanda batas dan dikocok hingga homogen.

2.5 Penetapan Kadar (+)-Katekin dalam Minuman Gambir Kombucha Lokal Bali dan Larutan Produk Gambir

Penetapan kadar (+)-katekin dalam minuman gambir kombucha lokal Bali, dilakukan dengan memipet 50 mL minuman gambir kombucha lokal Bali ke dalam corong pisah, kemudian dipartisi menggunakan 50 mL etil asetat p.a. Fase etil asetat ditampung (Larutan A). Prosedur yang sama dilakukan pada larutan produk gambir yaitu dengan cara memipet 50 mL larutan produk gambir kedalam corong pisah dan dipartisi menggunakan 50 mL etil asetat p.a. Fase etil asetat ditampung (Larutan B).

Dipipet masing-masing 0,01 mL larutan A dan B ditambahkan dengan etil asetat hingga 5 mL. Selanjutnya diukur serapannya dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 279 nm (SNI, 2000). Prosedur di atas diulangi sebanyak 3 kali. Kadar (+)-katekin dalam minuman gambir kombucha lokal Bali dan larutan produk gambir dihitung dengan memasukkan nilai absorbansi minuman gambir kombucha lokal Bali dan larutan produk gambir kedalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari kurva kalibrasi standar (+)-katekin

2.6 Pengujian Aktivitas *Chelating* Logam Ion Besi Dengan Metode *Ferrous Ion Chelating* (FIC)

Metode pengujian aktivitas *chelating* logam ion besi dilakukan berdasarkan metode Nur Alam *et al.* (1994) yang dimodifikasi. Larutan uji masing-masing dibuat 6 seri konsentrasi. Pelarut yang digunakan untuk membuat variasi konsentrasi larutan uji standar (+)-katekin, larutan produk gambir dan Na₂EDTA adalah *Sterile Water For Irrigation* dengan pH 2,8 sedangkan minuman gambir kombucha lokal Bali menggunakan pelarut *Sterile Water For Irrigation*. Setiap 1 mL larutan uji masing-masing ditambahkan dengan 0,75 mL (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (0,027 mg/mL) dan 0,75 mL *ferrozine* (0,027 M). Larutan kontrol *chelating* 100% dibuat dengan mencampurkan 0,75 mL (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O (0,027 mg/mL) dan 0,75 mL *ferrozine* (0,027 M). Blanko yang digunakan adalah *Sterile Water For Irrigation*. Larutan-larutan tersebut diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit lalu diukur absorbansinya pada panjang

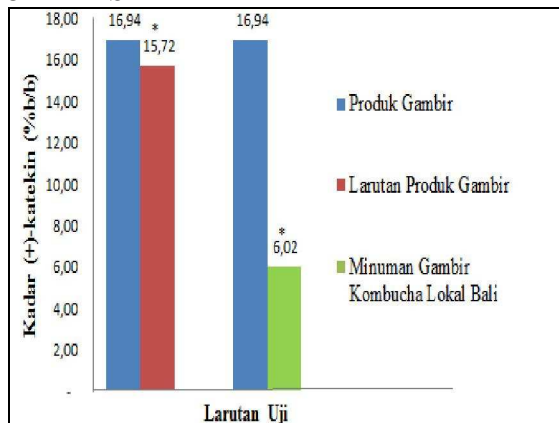
Uji Aktivitas *Chelating* Logam Ion Besi Minuman Gambir Kombucha Lokal Bali Secara *In Vitro* yang Berpotensi Untuk Pengobatan Alzheimer (Satiawan, I. P. J., Widjaja I.N.K., Leliqia N. P. E.)

gelombang maksimum kompleks Fe^{2+} -ferrozine.

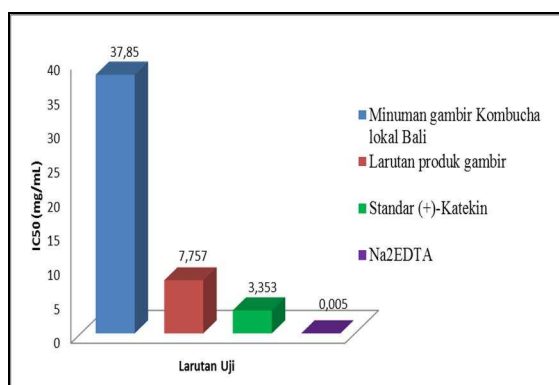
2.7 Analisis Data

Data IC_{50} dianalisis secara statistik dengan uji Kruskal Wallis dan Man Whitney dengan taraf kepercayaan 95%. Perbedaan signifikan dari nilai IC_{50} dinyatakan dengan nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

3 HASIL



Gambar 1. Penetapan kadar (+)-katekin dalam produk gambir, larutan produk gambir dan minuman gambir kombucha lokal Bali (* $p < 0,05$ dibandingkan produk gambir)



Gambar 2. Nilai penghambatan tengah (IC_{50}) minuman gambir kombucha lokal Bali, larutan produk gambir, standar (+)-katekin dan Na_2EDTA .

Pada gambar 1 menunjukkan bahwa kadar (+)-katekin pada produk gambir yang dibuat menjadi larutan produk gambir maupun minuman gambir kombucha lokal Bali mengalami penurunan yang signifikan ($P < 0,05$). Namun penurunan kadar (+)-katekin pada produk gambir yang dibuat larutan produk gambir lebih kecil dibandingkan

dengan penurunan kadar (+)-katekin pada produk gambir yang dibuat minuman gambir kombucha lokal Bali. Sedangkan pada gambar 2 terlihat terjadi peningkatan nilai IC_{50} minuman gambir kombucha lokal Bali dibandingkan larutan produk gambir dan standar (+)-katekin. Peningkatan nilai ini berbanding lurus dengan hasil penetapan kadar (+)-katekin (Gambar 1).

4 PEMBAHASAN

Pada gambar 1 terlihat bahwa penurunan kadar (+)-katekin pada produk gambir yang dibuat menjadi larutan produk gambir kemungkinan disebabkan oleh sifat (+)-katekin yang tidak stabil terhadap suhu. Pada pembuatan larutan produk gambir menggunakan suhu $65^{\circ}C$. Dimana berdasarkan hasil penelitian Volf *et al.* (2014) menunjukkan tingkat degradasi (+)-katekin terjadi kira-kira sebesar 20% pada suhu $60^{\circ}C$ dan 32% pada suhu $100^{\circ}C$.

Sedangkan penurunan kadar (+)-katekin pada produk gambir yang dibuat menjadi minuman gambir kombucha lokal Bali (Gambar 1) kemungkinan dapat disebabkan oleh dua faktor yang mempengaruhi stabilitas (+)-katekin dalam minuman tersebut yaitu faktor suhu dan adanya simbiosis bakteri dan *yeast* dalam kombucha. Pada pembuatan kombucha untuk melarutkan substrat produk gambir menggunakan suhu $65^{\circ}C$ seperti penjelasan sebelumnya pada suhu ini dapat terjadi degradasi (+)-katekin. Sedangkan adanya simbiosis bakteri dan *yeast* dalam kombucha akan membebaskan enzim yang akan mendegradasi (+)-katekin (Che Chu dan Chen, 2006). Selain itu berdasarkan penelitian yang dilakukan Viviandari dkk. (2014) menyatakan bahwa bakteri yang teridentifikasi dalam kombucha lokal Bali adalah bakteri asam asetat yang memiliki kemiripan dengan ciri bakteri asam asetat genus *acetobacter* yang bersifat aerob obligat, yang membutuhkan oksigen untuk hidup. Kemungkinan (+)-katekin memiliki sifat yang kurang stabil terhadap adanya oksigen. Sehingga hal ini dapat menyebabkan kadar (+)-katekin dalam minuman gambir kombucha lokal Bali mengalami penurunan.

Pada gambar 2 terlihat bahwa terjadi peningkatan yang signifikan ($p < 0,05$) dari nilai penghambatan tengah (IC_{50}) minuman gambir

kombucha lokal Bali dibandingkan larutan produk gambir dan standar (+)-katekin. Hal ini menunjukkan terjadinya penurunan aktivitas *chelating* logam ion besi oleh minuman gambir kombucha lokal Bali dibandingkan larutan produk gambir dan standar (+)-katekin. Penurunan aktivitas ini berbanding lurus dengan hasil penetapan kadar (+)-katekin (Gambar 1). Berdasarkan hasil tersebut, terjadinya penurunan aktivitas *chelating* logam ion besi oleh minuman gambir kombucha lokal Bali dipengaruhi oleh kandungan (+)-katekin. Penelitian yang dilakukan Mladenka *et al.* (2011) menyatakan bahwa aktivitas *chelating* logam ion besi oleh katekin dipengaruhi kondisi pH dimana pada kondisi mendekati pH fisiologis katekin memiliki aktivitas yang kuat tetapi pada pH rendah memiliki aktivitas yang rendah sehingga membutuhkan konsentrasi yang besar untuk memberikan aktivitas *chelating* logam ion besi. Hal ini diperkuat oleh penelitian yang dilakukan Chanjaya (2014) menyatakan bahwa terjadi penurunan pH minuman gambir kombucha lokal Bali yang signifikan selama fermentasi berlangsung. Hasil penelitian Che Chu dan Chen (2006) menyatakan hal serupa bahwa aktivitas *chelating* logam ion besi minuman kombucha teh hitam mengalami penurunan selama proses fermentasi dan menurun secara drastis setelah fermentasi hari ketiga.

Pada pengujian aktivitas *chelating* logam ion besi minuman gambir kombucha lokal Bali juga dilakukan perbandingan aktivitas *chelating* logam ion besinya dengan Na₂EDTA sebagai kontrol positif. Pada gambar 2 terlihat bahwa minuman gambir kombucha lokal Bali memiliki nilai IC₅₀ yang lebih besar dan berbeda signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan Na₂EDTA. Hal ini menunjukkan aktivitas *chelating* logam ion besi oleh minuman gambir kombucha lokal Bali lebih lemah dibandingkan Na₂EDTA. Na₂EDTA memiliki aktivitas *chelating* logam ion besi yang kuat, dikarenakan kemampuannya membentuk kompleks 1:1 yang stabil dengan semua logam kecuali dengan logam golongan alkali dan alkali tanah pada pH rendah (Gandjar dan Rohman, 2007). Meskipun Na₂EDTA memiliki aktivitas *chelating* logam ion besi yang kuat Na₂EDTA tidak digunakan sebagai agen pengkhelat pada tubuh. Hal ini disebabkan karena Na₂EDTA memiliki kemampuan yang sangat kuat dalam mengkhelat semua logam, termasuk logam-

logam esensial yang diperlukan dalam tubuh manusia.

Minuman gambir kombucha lokal Bali berdasarkan penelitian yang dilakukan Chanjaya (2014) dengan menggunakan metode DPPH telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan (*free radical scavenging*) dan berbanding lurus dengan kadar fenolik total. Tetapi berdasarkan penelitian ini didapatkan bahwa minuman gambir kombucha lokal Bali memiliki aktivitas *chelating* logam ion besi yang lemah yang berbanding lurus dengan kadar (+)-katekin. (+)-katekin merupakan salah satu senyawa flavonoid. Dimana berdasarkan penelitian Che Chu dan Chen (2006) menyatakan selama proses fermentasi minuman teh hitam kombucha terjadi modifikasi senyawa flavonoid menjadi senyawa sederhana yang dapat meningkatkan kadar fenolik total dan modifikasi tersebut menyebabkan senyawa flavonoid kehilangan aktivitas *chelating* logam ion besinya. Sehingga diduga dalam pengobatan Alzheimer, mekanisme kerja minuman gambir kombucha lokal Bali hanya berdasarkan aktivitas antioksidan melalui penangkapan radikal bebas (*free radical scavenging*). Adanya hubungan peningkatan kadar fenolik total yang berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan (*free radical scavenging*) memerlukan penelitian lebih lanjut berupa profil *fingerprint* untuk mengetahui senyawa-senyawa yang menyebabkan peningkatan kadar fenolik total tersebut.

5 KESIMPULAN

- 5.1 Minuman gambir kombucha lokal Bali memiliki aktivitas *chelating* logam ion besi dengan nilai IC₅₀ sebesar 37,85 mg/mL.
- 5.2 Minuman gambir kombucha lokal Bali memiliki aktivitas *chelating* logam ion besi lebih rendah dibandingkan standar (+)-katekin dan larutan produk gambir ($p < 0,05$).

DAFTAR PUSTAKA

- Alzheimer's Association. 2014. Alzheimer Disease Facts and Figure 2014. *Alzheimer and Dementia* 10 (2).
- Chanjaya, C. 2014. Pengaruh Fermentasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Minuman Kombucha Lokal di Bali dengan Substrat Produk Gambir (*Skripsi*). Bali: Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana.
- Che Chu, S. dan C. Chen. 2006. Effects of Origins and Fermentation Time on The Antioxidant Activities of Kombucha. *Food Chemistry* 98: 502–507.
- Gandjar, I. G dan A. Rohman. 2007. *Kimia Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar: 150 dan 256.
- Jaya, I.G.N.I.P., N.P.E. Leliqia dan I.N.K. Widjaja. 2011. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH Ekstrak Produk Teh Hitam (*Camelia Sinensis* L.O.K) dan Gambir (*Uncaria Gambir* (Hunter) Roxb) Serta Profil KLT Densitometernya. *Jurnal Farmasi Udayana*: 86-101.
- Mladenka, P., K. Macakova, T. Filipisky, L. Zatloukalova, L. Jahodar, P. Bovicelli, I. P. Silvestri, R. Hrdina and L. Saso. 2011. In Vitro Analysis of Iron Chelating Activity of Flavonoids. *Journal of Inorganic Biochemistry* 105: 693–701.
- Moeliono, A.P., N.M.D.D. Maryadhi, M.F. Cahyadi, N.M.F. Irmayanti dan N.P.E. Leliqia. 2014. Uji Aktivitas Antidementia Kombucha Lokal di Bali Dengan Substart Gambir. *Jurnal Farmasi Udayana*: 1-3.
- Nur Alam, Md., N.J. Bristi, Md. Rafiqzaman. 2013. Review on In Vivo And In Vitro Methods Evaluation Of Antioxidant Activity. *SPJ* 21: 143–152.
- Smith, D.G., R. Cappai and K.J. Barnham. 2007. The Redox Chemistry of The Alzheimer's Disease Amyloid B Peptide. *BBA* 1768: 1976-1990.
- SNI. 2000. *Gambir*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional. Hal 1-6
- Taniguchi, S., K. Kuroda, K.I. Doi, K. Inada, N. Yoshikado, Y. Yoneda, M. Tanabe, T. Shibata, T. Yoshida and T. Hatano. 2007. Evaluation of Gambir Quality Based on Quantitative Analysis of Polyphenolic Constituents. *PSJ* 127 (8): 1291-1300
- Viviandari, I.D.A.A. 2014. Identifikasi Molekuler Bakteri yang Terlibat dalam Proses Pembuatan Kombucha Lokal Bali (*Skripsi*). Bali: Jurusan Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Udayana.
- Volf, I., I. Ignat, M. Neamtu, V. I. Popa. 2013. Thermal Stability, Antioxidant Activity and Photo-Oxidation of Natural Polyphenols. *Chemical Papers* 68 (1) 121-129.