

PENGHAMBATAN OKSIDASI LDL OLEH EKSTRAK AIR JAHE (*Zingiber officinale* Roscoe) SECARA *IN VITRO*

(PREVENTION OF LDL OXIDATION BY WATER EXTRACT OF GINGER (*Zingiber officinale* Roscoe) *IN VITRO*)

Aisyah Tri Septiana¹⁾, Fransiska Rungkat Zakaria²⁾

ABSTRACT

Oxidative modification of LDL is believed to play an important role in atherogenesis. Water extract of ginger rhizomes exhibited antioxidative activity is higher than α tocopherol using linoleic acid as substrate. In addition, these extract is kind of ginger extract that daily consumed so may be can be used as funtional food. We investigated the effect of *in vitro* these extract enrichment of LDL on the prevention of oxidative LDL by CuSO₄. Plasma was supplemented with 430, or 4300 μ g/ml water extract in dimethylsulfoxide (DMSO) (10 μ l DMSO per ml plasma), incubated, and the LDL was isolated. Ginger extract also was supplemented on LDL isolate, and incubated. Lag phase and malonaldehyde content was analized after the isolated LDL was oxidized using CuSO₄.

The result showed that water extract of ginger rhizomes supplementation reduced malonaldehyde formation depended on its supplementation. Suplementation these extract on plasma (4300 μ g/ml plasma) only reduced 19,04 % malonaldehyde content, whereas α tocopherol supplementation can reduced 26,29 % malonaldehyde formation. These extract supplementation on LDL isolate can reduced 43,91 % malonaldehyde formation. This research has shown that ginger extract is capable of protecting LDL from oxidation.

Key words : ginger (*Zinger officinale* Roscoe), ginger extract, LDL, lag phase, malonaldehyde.

PENDAHULUAN

Tanaman jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) telah lama dikenal dan tumbuh dengan baik di Indonesia. Jahe merupakan salah satu rempah-rempah yang penting. Penggunaan rimpang jahe antara lain sebagai bumbu dapur, pemberi aroma dan rasa pada makanan dan minuman, serta untuk kesehatan. Manfaat jahe bagi kesehatan telah lama dikenal, antara lain untuk penyakit batuk (*antitussive*), muntah (*antiemetic*), dan untuk mengurangi gas dalam lambung (*antiflatulent*) (Omar, 1992).

Dewasa ini banyak dikembangkan produk pangan fungsional yaitu suatu produk pangan yang memberikan keuntungan terhadap kesehatan. Meskipun demikian, manfaat produk pangan tersebut belum sepenuhnya dimengerti secara ilmiah. Sebagai pangan fungsional, rimpang jahe yang diekstrak menggunakan air biasa digunakan sehari-hari. Hal ini merupakan salah satu alasan penggunaan ekstrak air jahe pada penelitian ini.

Beberapa macam penyakit yang didasari oleh *stress oksidative* dapat dihambat oleh antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat bereaksi oleh oksidan, sehingga menghambat reaksi oksidasi. Menurut Septiana (2001), ekstrak air jahe pada substrat asam linoleat lebih besar dibandingkan α tokoferol.

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak air jahe dalam menghambat oksidasi LDL (lipoprotein densitas rendah) secara *in vitro*. Penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe memungkinkan penggunaan ekstrak air jahe sebagai pangan fungsional dalam menghambat aterosklerosis (penyumbatan pembuluh darah), karena salah satu asal mula terjadinya aterosklerosis adalah adanya LDL teroksidasi.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan adalah rimpang jahe putih besar atau biasa disebut jahe gajah yang berumur 10 bulan dari perkebunan Balitro Cimanggu Bogor, air bebas ion, darah dari responden laki-laki yang sehat, serta reagen-reagen untuk isolasi LDL dan analisisnya.

Alat-alat yang digunakan adalah penggiling jahe kering, pengering beku (*freeze dryer*), evaporator vakum berputar (*rotary vacum evaporator*), spektrofotometer, spektrofotometer UV-VIS, ultrasentrifus, pisau pengiris tabung, dan alat gelas.

Metode Penelitian

Ekstraksi jahe

Ekstraksi jahe menggunakan air dilakukan terhadap bubuk jahe yang dikering bekukan. Setiap 25 gram bubuk jahe membutuhkan 125 ml air. Mula-mula bubuk jahe diekstraksi dengan cara seperti membuat minuman jahe, sebanyak 3 kali. Untuk memperoleh ekstrak jahe, minuman jahe dikeringbekukan sehingga air yang ada menguap.

Suplementasi ekstrak jahe pada LDL, serta isolasi dan oksidasi LDL

Suplementasi ekstrak air jahe pada LDL dilakukan melalui 2 cara yaitu dengan menambahkan pada plasma dari satu orang responden sebelum isolasi LDL, dan dengan menambahkan langsung pada isolat LDL. Penambahan ekstrak air jahe pada plasma dilakukan seperti yang telah dijelaskan oleh Suzukawa *dkk* (1994)

¹⁾ Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, UNSOED Purwokerto

²⁾ Program Studi Ilmu Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB Bogor

menggunakan α tokoferol, yang pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol. Plasma disuplementasi dengan α tokoferol 1000 nmol/ml (430 μ g/ml), dan ekstrak air jahe 430, dan 4300 μ g/ml plasma yang dilarutkan pada dimetilsulfoksida/DMSO (10 μ l DMSO per ml plasma), dan diinkubasi pada 37°C selama 3 jam. Kemudian, LDL diisolasi. Penggunaan konsentrasi 4300 μ g/ml plasma dilaksanakan berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Sulistiyani dan St. Clair (1997).

Pada prinsipnya pemisahan LDL dilakukan setelah β VLDL yang mempunyai $d < 1,006$ g/ml dipisahkan menggunakan larutan pemisah densitas, yaitu 0,9 % NaCl dan 0,01 % EDTA (w/v) dan ultrasentrifugasi 36 000 rpm selama 20 jam. Kemudian fraksi yang telah dikurangi β VLDLnya diatur densitasnya dengan KBr sampai 1,080 g/ml, dan memisahkan fraksi yang densitasnya (d) $> 1,063$ g/ml dengan larutan pemisah densitas dan ultrasentrifugasi 24 jam (Sulistiyani dan St. Clair, 1991).

Pada sub penelitian yang lain, suplementasi ekstrak air jahe dilakukan dengan cara menambahkan langsung pada isolat LDL. Sebanyak 2150 μ g ekstrak air jahe diinkubasi dengan 1 ml LDL selama 3 jam. Setelah LDL dioksidasi menggunakan CuSO_4 , dilakukan analisis terhadap kadar malonaldehid. Penggunaan konsentrasi 2150 μ g/ml LDL dilaksanakan berdasarkan penelitian pendahuluan.

Oksidasi LDL dilakukan dengan menginkubasi LDL yang telah disuplementasi ekstrak air jahe menggunakan 5 μ M CuSO_4 pada larutan 0,9 % NaCl-1 mM NaHCO_3 pH 7,4 suhu 37°C selama 90 menit. Reaksi dihentikan dengan penambahan EDTA (konsentrasi akhir 0,1 %) seperti yang dilakukan oleh Suzukawa *dkk* (1994) menggunakan α tokoferol. Lipid LDL yang teroksidasi diukur dengan mengukur kadar malonaldehid dan fase lag.

Analisis kadar malonaldehid dari LDL

Kedalam 50 μ l sampel LDL maupun standar (tetraetoksipropana) ditambahkan 1 ml TBA (10 mmol dalam 75 mmol/l buffer fosfat). Semua tabung diinkubasi selama 60 menit pada penangas air bersuhu 95°C, kemudian didinginkan, ditambahkan 5 ml butanol, divortex selama 1 menit dan disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 1.000 rpm. Pada tabung yang ditemukan endapan, dilakukan pemisahan. Supernatan yang diperoleh diukur absorbansinya pada panjang gelombang eksitasi 515 nm dan panjang gelombang emisi 553 nm (Conti *dkk*, 1991).

Analisis fase lag dari LDL

LDL (50 μ g protein/ml) dioksidasi dengan penambahan 5 μ M CuSO_4 (konsentrasi akhir) pada 37°C. Kinetika oksidasi untuk menghitung fase lag dilakukan dengan mengukur absorbansi pada 234 nm pada periode waktu tertentu. Fase lag yang merupakan fase sebelum atau mulai terjadinya oksidasi diukur dari mulai penambahan CuSO_4 dengan titik perpotongan tangen fase propagasi yang diekstrapolasikan ke waktu (absis). Fase lag dinyatakan dalam menit (Suzukawa *dkk*, 1994).

Analisis yang lain

Selain analisis terhadap fase lag dan kadar malonaldehid dari LDL, dilakukan analisis terhadap kadar protein LDL dan profil lipid responden yang meliputi kolesterol LDL (LDL-c), kolesterol HDL (HDL-c), total kolesterol dan trigliserida. Analisis profil lipid menggunakan metoda CHOD-PAP dari Boehringer Mannheim. Protein LDL diukur dengan uji Lowry menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standard.

Analisis Statistik

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Untuk menganalisis hasil rancangan tersebut, digunakan uji Duncan dengan taraf kepercayaan 1 % dan 5 %.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe yang disuplementasikan pada plasma sebelum isolasi LDL

Uji penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe yang disuplementasikan pada plasma sebelum isolasi LDL dilakukan dengan cara mengukur fase lag dari data kinetika oksidasi, dan dengan mengukur konsentrasi malonaldehid dari LDL yang telah dioksidasi menggunakan CuSO_4 . Kinetika oksidasi LDL yang disuplementasi ekstrak air jahe pada plasma sebelum isolasi LDL terlihat pada Gambar 1. Pengukuran kinetika oksidasi dilakukan dengan cara mengukur diena terkonjugasi selama periode waktu tertentu, sehingga dapat diketahui fase lag.

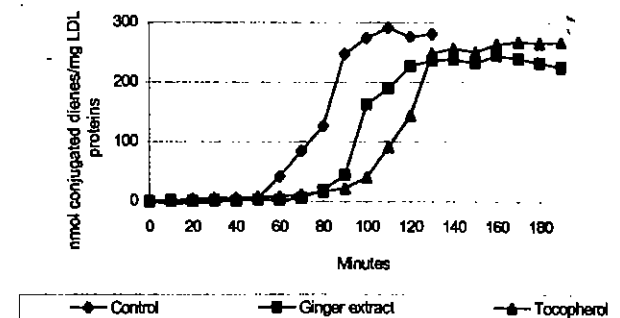


Figure 1. Oxidation kinetics of supplemented LDL by water extract of ginger (4300 μ l/ml plasma) compare to α tocopherol in plasma before LDL isolation

Gambar 1 memperlihatkan bahwa suplementasi ekstrak air jahe pada plasma sebelum isolasi LDL memberikan pengaruh terhadap perpanjangan fase lag. Fase lag adalah fase sebelum atau mulai terjadinya oksidasi. Pada fase ini terjadi oksidasi yang tergantung antioksidan endogen. Fase lag diperoleh dari tangen kurva tercuram yang diekstrapolasikan ke waktu. Interval penambahan CuSO_4 dengan titik perpotongan kurva dari waktu tersebut didefinisikan sebagai fase lag (Princen *dkk*, 1992). Data perhitungan fase lag terlihat pada Tabel 1.

Table 1. Lag phase of supplemented LDL by water extract of ginger (4300 µg/ml plasma) in plasma before LDL isolation

Kinds and concentration of antioksidant (µg/ml plasma)	Lag phase (minutes)	Increase of lag phase compare with control (%)
Control + CuSO ₄	58,53 ^a	-
Ginger extract, 4300	77,10 ^b	31,73
α tocoferol, 430	90,41 ^c	54,47

P < 0,01 (vs control + CuSO₄)

Hasil penelitian pada Tabel 1 memperlihatkan adanya peningkatan fase lag yang sangat nyata dari LDL yang disuplementasi ekstrak air jahe. Secara *in vitro*, Frankel *dkk* (1993) juga menemukan bahwa komponen fenolik pada anggur merah mampu menghambat fase lag dari LDL secara nyata dibandingkan dengan α tokoferol. Berbeda dengan penelitian tersebut, penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe ternyata tidak lebih baik dibandingkan α tokoferol.

Untuk melihat lebih lanjut aktivitas antioksidan ekstrak air jahe, dilakukan pengukuran malonaldehid dari LDL yang disuplementasi antioksidan tersebut pada plasma sebelum isolasi LDL seperti terlihat pada Tabel 2. Pada konsentrasi 430 µg/ml plasma, ekstrak air jahe kurang mampu menghambat pembentukan malonaldehid dibandingkan pada konsentrasi 4300 µg/ml plasma. Padahal menurut Septiana (2001), ekstrak diklorometan jahe membutuhkan 430 µg/ml plasma untuk menghambat pembentukan malonaldehid. Dengan demikian, konsentrasi ekstrak air jahe yang dibutuhkan untuk menghambat pembentukan malonaldehid lebih besar dibandingkan ekstrak diklorometan jahe. Hal ini nampaknya berhubungan dengan kadar total fenol yang ada pada ekstrak air jahe dan ekstrak diklorometan jahe.

Hasil penelitian memperlihatkan bahwa total fenol ekstrak air jahe adalah 4,8 mg/g (db) dan total fenol ekstrak diklorometan adalah 18,7 mg/g (db). Kadar total fenol ekstrak diklorometan jahe adalah 3,9 x ekstrak air jahe. Seperti halnya dengan penghambatan oleh ekstrak jahe, penghambatan pembentukan malonaldehid dari LDL teroksidasi oleh minuman anggur merah dan juice anggur (Miyagi *dkk*, 1997) disebabkan oleh adanya komponen fenolik yang berfungsi sebagai antioksidan (Frankel *dkk*, 1993; Miyagi *dkk*, 1997; Nigdikar *dkk*, 1998).

Table 2. Malonaldehid (MDA) concentration of supplemented LDL by water extract of ginger (430, 4300 µg/ml plasma) in plasma before LDL isolation

Antioksidants concentration (µg/ml plasma)	MDA concentration (nmol MDA/mg protein)	Decrease of MDA concentration compare with control (%)
Control + CuSO ₄	8,40 ^a	-
Ginger extract, 430	7,50 ^b	10,71
Ginger extract, 4300	6,80 ^c	19,04
α tocoferol, 430	5,64 ^d	26,79
Control - CuSO ₄	1,20 ^e	-

P < 0,01 (vs control + CuSO₄)

Perbandingan hasil pengaruh suplementasi ekstrak air jahe dibandingkan α tokoferol terhadap fase lag dan kadar malonaldehid terlihat pada Gambar 2. Ekstrak air jahe (4300 µg/ml plasma) maupun α tokoferol lebih mampu menghambat fase lag (pembentukan hidroperoksida) dibandingkan pembentukan malonaldehid. Dengan cara suplementasi ekstrak air jahe pada plasma, ekstrak air jahe (4300 µg/ml plasma) dapat menghambat 31,73 % fase lag tetapi hanya menghambat 19,04 % pembentukan malonaldehid. Fenomena ini ternyata juga berlaku pada penghambatan oksidasi oleh ekstrak diklorometan jahe (Septiana, 2001). Mekanisme penghambatan oksidasi oleh ekstrak air dan ekstrak diklorometan jahe mungkin sama dengan α tokoferol yaitu dengan cara memberikan atom hidrogen pada radikal lipid sehingga menghambat terjadinya reaksi propagasi yang berakibat terhadap penghambatan fase lag.

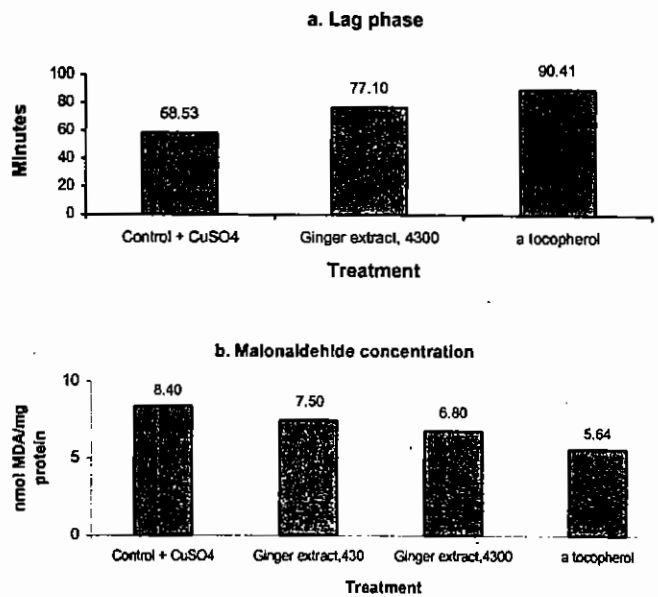


Figure 2. Effect water extract of ginger supplementation (430 dan 4300 µg/ml plasma) compare with α tocoferol in plasma to lag phase (a) and malonaldehid concentration (b)

Dibandingkan LDL tersuplementasi α tokoferol, penghambatan fase lag dan malonaldehid dari LDL tersuplementasi ekstrak air jahe lebih rendah. Suplementasi antioksidan pada plasma sebelum isolasi LDL menghasilkan aktivitas antioksidan ekstrak air jahe pada LDL lebih rendah dibandingkan α tokoferol.

Ekstraksi rimpang jahe menggunakan air menghasilkan ekstrak air jahe yang larut dalam air. Air merupakan pelarut yang paling polar dibandingkan pelarut yang lain. Karena polaritasnya yang sangat tinggi maka komponen-komponen yang terekstrak oleh air juga mempunyai polaritas yang sangat tinggi atau diselimuti komponen yang mempunyai polaritas tinggi (Spiro *dkk*, 1990). Disisi lain, LDL yang bersifat kurang polar dibanding air karena mengandung fosfolipid dan kolesterol bebas di bagian luar diisolasi dari larutan *aqueous*

(plasma) sehingga ekstrak air jahe sukar untuk tersuplementasi dalam LDL, tetapi lebih mudah larut pada larutan *aqueous*.

Penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe yang disuplementasikan pada isolat LDL

Selain dengan menambahkan pada plasma diikuti proses isolasi LDL melalui cara ultrasentrifugasi, suplementasi ekstrak air jahe dilakukan dengan cara menginkubasi ekstrak air jahe bersama isolat LDL pada 37°C selama 3 jam. Hasil analisis malonaldehid dari LDL yang disuplementasi ekstrak air jahe pada isolat LDL terlihat pada Tabel 3.

Table 3. Malonaldehyde (MDA) concentration of supplemented LDL by water extract of ginger (2150 µg/ml LDL) in LDL isolate

Kinds and concentration of antioksidant	MDA concentration (nmol MDA/mg protein)	Decrease of MDA concentration compare with control (%)
Control - CuSO ₄	1,93 ^a	-
Control + CuSO ₄	8,95 ^b	-
Ginger extract, 2150	5,02 ^c	43,91

P < 0,01 (vs control + CuSO₄)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan cara menginkubasi ekstrak air jahe pada isolat LDL, ekstrak air jahe (2150 µg/ml LDL) dapat menghambat pembentukan malonaldehid sebesar 43,91 %. Hasil penelitian sebelumnya, dengan cara mensuplementasikan ekstrak jahe pada plasma (4300 µg/ml plasma) hanya menghambat pembentukan malonaldehid sebesar 19,04 %.

Isolasi LDL pada prosedur suplementasi ekstrak air jahe kemungkinan mempengaruhi aktivitas antioksidan yang disuplementasikan ke LDL. Proses pemisahan lipoprotein dengan ultrasentrifugasi dapat terjadi karena adanya perbedaan densitas. Setelah VLDL yang mempunyai densitas < 0,95 - 1,006 dipisahkan, LDL yang mempunyai densitas 1,019-1,063 dengan kadar lipid 79 % akan terpisah di bagian atas. Disisi lain, air sesuai dengan sifat polaritasnya yang tinggi akan mengekstrak komponen yang mempunyai polaritas yang tinggi atau diselimuti komponen yang mempunyai polaritas tinggi. Ekstrak air jahe pada proses ultrasentrifugasi kemungkinan akan terendapkan. Hal inilah yang mungkin menyebabkan aktivitas antioksidan ekstrak air jahe yang disuplementasikan pada plasma yang akan diisolasi LDLnya lebih rendah dibandingkan suplementasi ekstrak air jahe pada isolat LDL tanpa proses ultrasentrifugasi.

Berbeda dengan ekstrak air jahe, suplementasi ekstrak diklorometan jahe yang telah dilakukan oleh Septiana (2001) lebih cocok dilakukan dengan inkubasi ekstrak tersebut pada plasma sebelum ultrasentrifugasi. Diklorometan merupakan pelarut yang kurang polar (Adnan, 1990), sehingga komponen kurang polar yang pada umumnya mempunyai densitas kecil akan terekstrak oleh pelarut tersebut. Proses ultrasentrifugasi tidak mengendapkan ekstrak diklorometan jahe tetapi membantu ekstrak tersebut kontak dengan LDL sehingga lebih melindungi LDL dari oksidasi. Dengan demikian,

aktivitas antioksidan jahe pada LDL tergantung pelarut yang digunakan untuk mengekstrak dan cara suplementasi pada LDL.

KESIMPULAN

Ekstrak air jahe dapat menghambat oksidasi LDL terbukti dari kemampuannya dalam menghambat fase lag dan malonaldehid. Penghambatan oksidasi LDL oleh ekstrak air jahe tergantung cara suplementasinya. Suplementasi ekstrak jahe tersebut pada plasma hanya mampu mengurangi 19,04 % kadar malonaldehid, padahal suplementasi α tokoferol dapat mengurangi 26,29 % pembentukan malonaldehid. Suplementasi ekstrak air jahe pada isolat LDL dapat mengurangi 43,91 % pembentukan malonaldehid.

Ekstrak air jahe lebih mampu untuk menghambat fase lag (produk primer dari oksidasi) dibandingkan malonaldehid yang merupakan produk yang lebih lanjut dari oksidasi. Dengan cara suplementasi ekstrak air jahe pada plasma, ekstrak air jahe (4300 µg/ml plasma) dapat menghambat 31,73 % fase lag, tetapi hanya menghambat 19,04 % pembentukan malonaldehid.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. 1990. Teknik Kromatografi untuk Penelitian Bahan Pangan. PAU Ilmu Pangan dan Gizi UGM. Yogyakarta.
- Conti, M., P.C. Morand, P. Levillain, dan A. Lemonier. 1991. Improved Fluorimetric Determination of Malonaldehyde. *Clin. Chem.* 37 : 1273-1275.
- Esterbauer, H., M.Dieber-Rotheneder, G.Striegl, dan G.Waeg. 1991. Role of Vitamin E in Preventing The Oxidation of Low Density Lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 314S-322S
- Frankel, E.N., J. Kanner, J.B. German, E. Parks, dan J.E. Kinsella. 1993. Inhibition of Oxidation of Human Low Density Lipoprotein by Phenolic Substance in Red Wine. *Lancet* 341 : 454-457.
- Mijagi, Y., K. Miwa, dan H. Inoue. 1997. Inhibition of Low Density Lipoprotein Oxidation by Flavonoids in Red Wine and Grape Juice. *Am. J. of Cardiol.* 80 : 1627-1631.
- Nigdikar, S.V., N.R. Williams, B.A. Griffin, dan A.N. Howard. 1998. Consumption of Red Wine Polyphenols Reduces The Susceptibility of Low Density Lipoprotein to Oxidation in Vitro. *Am. J. Clin. Nutr.* 68 : 258-265.
- Omar, M.M. 1992. Phenolic Compounds in Botanical Extract Used in Foods, Cosmetic and Pharmaceutical. *Dalam : Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II. , Antioxidants and Cancer Prevention.* Huang, M.T., C.T. Ho. and C.Y. Lee (eds). American Chemical Society. Washington.
- Princen, H.M.G., G. van Poppel, C. Voegelzang, R. Buytenhek, dan F.J. Kok. 1992. Supplementation with Vitamin E but Not β Carotene in Vivo Protects Low Density Lipoprotein from Lipid Peroxidation in Vitro: Effect of Cigarette Smoking. *Arteriosclerosis and Thrombosis.* 12 : 554-562.

- Spiro, M., M. Kandiah, dan W. Price. 1990. Extraction of Ginger Rhizoma : Kinetic Studies with Dichlorometan, Ethanol, 2-propanol and an Acetone-water Mixture. *International Journal of Food Science and Technology* 25 : 157-167.
- Septiana, A.T. 2001. Aktivitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) dalam Pencegahan Oksidasi Lipoprotein Densitas Rendah (LDL) dan Akumulasi Kolesterol pada Makrofag secara In Vitro. Disertasi Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Sulistiyani, dan R.W. St. Clair. 1991. The Method of Isolation of Primary Cells and Their Expression of LDL Receptors on Pigeon and Chicken Embryo Cells in Culture. *Atherosclerosis* 91: 123-135.
- Sulistiyani, dan R.W. St. Clair. 1997. Effect of Estradiol on Metabolism of Acetylated Low Density Lipoprotein by Macrophage in Culture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 1691-1700.
- Suzukawa, M., M. Abbey, P. Clifton, dan P.J. Nestel. 1994. Effect of Supplementing with Vitamin E on The Uptake of Low Density Lipoprotein and The Stimulation of Cholesteryl Ester Formation in Macrophages. *Atherosclerosis* 110 (1) : 77-86.