



MATA KULIAH PENUNJANG DISERTASI

**FARMAKOKINETIK DAN FARMAKODINAMIK
ANTOSIANIN DARI EKSTRAK UBI JALAR UNGU**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA**

2020

FARMAKOKINETIK DAN FARMAKODINAMIK ANTOSIANIN DARI EKSTRAK UBI JALAR UNGU

PENDAHULUAN

Meningkatnya umur harapan hidup menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah lanjut usia (lansia) dan permasalahannya, yaitu timbulnya penyakit akibat proses penuaan antara lain berupa penurunan fungsi kognitif yang disebut dengan demensia. Demensia merupakan sindroma penurunan kemampuan intelektual progresif yang menyebabkan gangguan kognitif, perilaku dan aktivitas fungsional keseharian. Demensia menyebabkan kecacatan dan ketergantungan pada lansia sehingga diperlukan upaya-upaya untuk menjaga kemampuan kognitif para lansia agar kualitas kehidupannya tetap terjaga.

Penyebab terbanyak demensia adalah demensia Alzheimer (DA) yang pada fase awal ditandai dengan penurunan fungsi memori progresif kemudian berkembang melibatkan beberapa domain kognitif, gangguan neuropsikologi dan perubahan perilaku (Ong *et al.*, 2015). Tanda neuropatologis utama pada DA adalah deposisi plak *amyloid beta* (A β) ekstraselular, pembentukan *neurofibrillary tangle* (NFT), neuroinflammasi kronis dan hilangnya neuron kolinergik. *Amyloid beta* merupakan ciri patologis DA yang menyebabkan kerusakan neuronal melalui stres oksidatif, aktivasi kaspase dan disfungsi mitokondria (Kumar *et al.*, 2016).

Belum terdapat terapi efektif untuk demensia. Salah satu upaya perlindungan terhadap ROS dalam penuaan dan gangguan neurodegeneratif adalah dengan meningkatkan aktivitas pertahanan biologis melalui antioksidan. Antioksidan digunakan untuk menghambat pembentukan radikal bebas akibat stress oksidatif. Semakin banyak bukti yang menunjukkan bahwa senyawa flavonoid efektif dalam mencegah onset dan memperlambat perkembangan DA (Williams and Spencer, 2012). Antosianin sama seperti flavonoid lainnya merupakan antioksidan unik karena dapat menghancurkan ROS dan RNS secara langsung, yang bisa dinilai dari tingginya kapasitas absorpsi dari radikal oksigen (ORAC) dan peningkatan pertahanan antioksidan intrinsik dari sel (Hwang *et al.*, 2011).

A. ANTOSIANIN

Antosianin merupakan senyawa berwarna yang bertanggung jawab untuk kebanyakan warna merah, biru, dan ungu pada buah, sayur, dan tanaman hias. Senyawa ini termasuk dalam golongan flavonoid. Struktur utamanya ditandai dengan adanya dua cincin aromatik benzena (C_6H_6) yang dihubungkan dengan tiga atom karbon yang membentuk cincin. Antosianin disusun dari sebuah aglikon (antosianidin) yang teresterefikasi dengan satu atau lebih gugus gula (glikon). Kebanyakan antosianin ditemukan dalam enam bentuk antosianidin, yaitu pelargonidin, sianidin, peonidin, delphinidin, petunidin, dan malvidin. Gugus gula pada antosianin bervariasi, namun kebanyakan dalam bentuk glukosa, ramnosa, galaktosa, atau arabinosa. Gugus gula ini bisa dalam bentuk mono atau di-sakarida dan dapat diasilasi dengan asam fenolat atau asam alifatik (Andarwulan *et al.*, 2012).

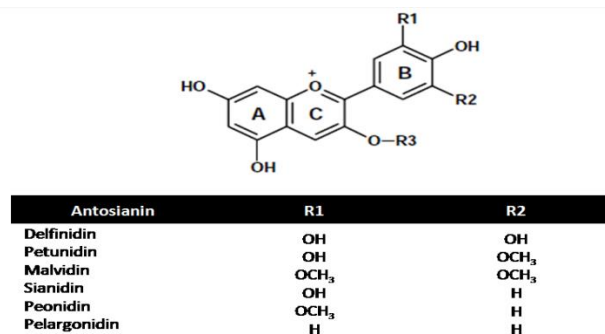
Beberapa temuan menunjukkan bahwa antosianin memperbaiki kerusakan akibat proses neurodegenerasi seperti stres oksidatif dan stress nitrosatif, eksitotoksisitas, inflamasi pada glia, agregasi protein, dan induksi protein pada sinyal apoptosis. Bukti juga menunjukkan bahwa antosianin mampu melintasi BBB dengan menunjukkan efek langsungnya pada neuron yang mengalami kematian di SSP pada penyakit Alzheimer (Youdim *et al.* 2003). Terdapat sekitar 539 jenis antosianin yang telah diekstrak dari tanaman. Kandungan antosianin berbeda pada beberapa tanaman per 100 gramnya seperti *blueberries* mengandung 330 mg, *chokeberries* 660 mg, buah kemiri 500 mg, buncis 790 mg, coklat 1630 mg, gandum 1900mg, bunga anggur 3500 mg dan kayu manis 8100mg. Ubiungu kulvitar bali mengandung 157 mg/100 gr (Gu *et al.*, 2004; Suprpta *et al.*, 2004).

Warna dominan daging umbi ubi jalar berkorelasi dengan kandungan antosianin, semakin pekat warna ungu, semakin tinggi kandungan antosianin umbi. Ubi jalar ungu pekat segar memiliki aktivitas antioksidan lebih besar dari aktivitas antioksidan ubi jalar ungu muda yaitu. Berdasarkan penelitian Dwidjanarko (2008), aktivitas antioksidan tertinggi pada ubi jalar ungu adalah 61,24%–89,06%. Meskipun kadar antosianin ubi jalar ungu pekat 17 kali lebih tinggi dibandingkan dengan kadar antosianin ubi jalar ungu muda, tetapi aktivitas antioksidan kedua jenis ubi jalar tersebut tidak menunjukkan perbedaan yang terlalu besar. Hal ini diduga disebabkan oleh adanya senyawa lain yang berfungsi sebagai antioksidan pada ubi jalar ungu muda. Senyawa antioksidan selain antosianin yang terdapat pada ubi jalar adalah asam fenolat, tokoferol (vitamin E), lutein, zeaxanthin, dan beta karoten yang merupakan pasangan antioksidan karotenoid (Teow *et al.*, 2007). Menurut Andayani *et al.* (2008), senyawa fenol yang memiliki

aktivitas antioksidan biasanya memiliki gugus –OH dan –OR seperti avonoid dan asam fenolat. Senyawa fenol bisa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif menghambat oksida lipida (Husna *et al.*, 2013).

B. STRUKTUR ANTOSIANIN

Struktur kimia antosianin yang terdapat pada spesies *Ipomea batatas* yang telah diidentifikasi oleh Otake et al. (1992) adalah sianidin dan peonidin-3-kafeilferulisoforosida-5-glukosida. Sumber lain menyebutkan bahwa ubi ungu mengandung antosianin dari jenis sianidin-3-glukosilfruktosida-5-xilosida yang diasilasi dengan asam kafeat dan ferulat atau turunan petunidin dan pelargonidin-3,5-diglukosida yang diasilasi asam p-kumarat (Otake *et al.*, 1992)



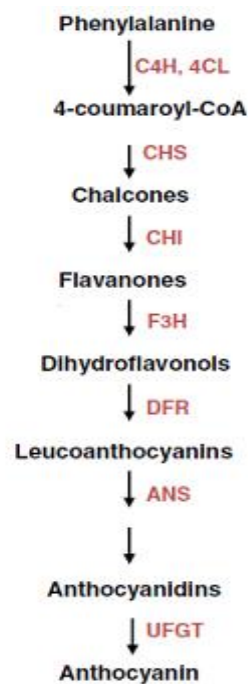
Gambar 2.2.1 Rumus struktur antosianin (Mateus N, de Freitas V., 2009)

Substitusi beberapa gugus kimia pada rangka antosianin dapat mempengaruhi warna yang diekspresikan oleh antosianin dan kestabilannya. Penambahan gugus glikosida atau peningkatan jumlah gugus hidroksi bebas pada cincin A menyebabkan warna cenderung biru dan relatif tidak stabil. Sebaliknya, penambahan jumlah gugus metoksi atau metilasi akan menyebabkan warna cenderung merah dan relatif stabil. Asam fenolat diketahui dapat menstabilkan dan memperkuat warna antosianin. Ko-pigmentasi juga dapat terjadi dengan keberadaan logam. Beberapa logam bervalensi dua atau tiga seperti magnesium dan aluminium dapat membentuk kompleks dengan antosianin dan menciptakan warna biru. Bentuk kompleks tersebut menyebabkan antosianin lebih stabil. Reaksi ko-pigmentasi ini dapat terjadi dengan dua macam mekanisme. Pertama, terjadi reaksi intramolekul melalui ikatan kovalen pada gugus aglikon antosianin dengan asam organik, senyawa aromatik, flavonoid, atau kombinasi ketiganya. Mekanisme kedua yaitu reaksi intramolekular yang melibatkan pembentukan ikatan hidrofobik yang lemah antara flavonoid dan antosianin (Mateus *et al.*, 2009).

Warna antosianin tergantung dari substitusi yang terjadi pada cincin B dan saturasi warna akan meningkat dengan jumlah grup hidroksil dan terjadi penurunan dengan penambahan grup metoksi. Bila terjadi kondisi asam yang tinggi maka warna antosianin akan merah dan relatif stabil. Bila keasaman

lemah atau pH netral maka warna antosianin akan berkurang dan menjadi tidak stabil. Antosianin pada ubiungu yang mengandung sianidin dan peonidin lebih banyak dibandingkan tanaman lainnya dalam penyerapan mengalami asetilasi sehingga menjadi lebih stabil. Kandungan sianidin yang lebih banyak akan menyebabkan warna ungu lebih dominan atau disebut tipe cyanidin (perbandingan $peo/cy < 1$) dan bila kandungan peonidin yang lebih banyak maka akan dominan berwarna merah atau disebut tipe peonidin (perbandingan $peo/cy > 1$) (Montilla *et al.*, 2011; de Pascual-Tresa, 2014).

Antosianin termasuk dalam grup flavonoid, yang biosintesisnya dari 1 molekul 4-coumaroyl-CoA dan 3 molekul malonyl-CoA, yang dengan bantuan enzim *chalconesynthase* (CHS), membentuk chalcone yang kemudian mengalami isomerisasi menjadi flavanones. Flavanone akan mengalami perubahan pada 2,3-dihydro-2-phenylchrome-4 one skeleton structure dan hidrosilasi dari C-3 pada cincin C akan berdifrensiasi menjadi beberapa jenis flavonoid. Enzim *flavanone 3-hydroxylase* (F3H) akan mengkatalase *stereospesific 3 β -hydroxylation of (2S) flavanones* menjadi *dihydroflavanols*. Pembentukan antosianin dilanjutkan dengan mengkalase dihydroflavanols oleh *dihydroflavanols reductase* (DFR) menjadi *flavan-3,4-diol (leucoanthocyanin)* yang kemudian dikonversi menjadi antosianidin oleh enzim *anthocyanidine synthetase* (ANS), yang oleh enzim *UDP glucoseflavonoid 3-0-glucosyl transferase* (UGFT) dikonversi menjadi antosianin seperti terlihat pada Gambar 2.5



Gambar 2.2.2 Biosintesis Antosianin (sumber Ghasemzadeh *et al.*; 2012, dengan modifikasi).

C. FARMAKOKINETIK ANTOSIANIN

Antosianin diabsorpsi di gaster dan intestinal dan berikatan dengan protein, sehingga konsentrasinya lebih tinggi dari pada plasma. Antosianin mengalami metabolisme di hati dengan mengalami metilasi glukoronidasi, selanjutnya akan di distribusikan ke seluruh tubuh, termasuk ke otak. Ekskresinya lewat urine (McGhie and Stevenson, 2014).

Antosianin ditemukan pada sel endotel otak dan pangsium otak setelah pemberian dosis tunggal per oral pada rodensia, sehingga diduga antosianin bisa melewati sawar darah otak (Youdin *et al.*; 2003). Tranpotasinya ke otak sangat cepat setelah makan dan dapat dijumpai dalam beberapa menit di jaringan. Antosianin sampai ke otak lewat mekanisme mirip dengan absorpsi di gaster dan saluran pencernaan lainnya, yaitu ikatan dengan bilirubin yang memungkinkan antosianin sampai ke otak. Ikatan antara antosianin dan bilirubin terjadi karena ikatan hidrogen yang tidak berubah yang memungkinkan terjadinya mekanisme tranport ini (Karawjczyk *et al.*, 2007). Kadar antosianin yang dapat ditransport lewat membran basolateral berbanding terbalik jumlah gugusan hidroksil pada cincin B, ini meengindikasikan perbedaan kadar lipofilisiti yang membedakan selektifitas antosianin lewat sawar darah otak (Yi *et al.*, 2006).

Antosianin adalah suatu polifenol yang menarik perhatian untuk dikembangkan sebagai terapi neurodegeneratif. Antosianin relatif hidrofilik, dibandingkan dengan antioksidan lainnya tetapi antosianin bisa melewati sawar darah otak dan masuk ke SSP. Distribusi antosianin di jaringan otak berbeda karena faktor perbedaan pengantarannya, metabolisme dan retensi jaringan otak. Area otak yang banyak mengandung antosianin (3-glukosid) adalah korteks, serebelum, batang otak dan diensefalon (Milbury and Kalt, 2010)

Konsentrasi yang utuh di otak setelah pemberian per oral cukup rendah dibawah konsentrasi yang mempunyai efek farmakologi dan neurprotktif. Secara *in vivo* metabolitnya dipercaya mempunyai efek farmakologi, dan mempunyai efek lain disamping sebagai antioksidan terhadap jaringan otak yaitu:

1. Melalui interaksi dengan kaskade neuronal dan sel glia yang sangat diperlukan untuk kehidupan sel otak terutama *fosfotidilinositol-3-kinase* (P3IK)/Akt dan *mitogen activated-protein kinase* (MAPK), dan regulasi *prosurvival transcription factor* dan ekspresi gen.

2. Kemampuannya memperbaiki aliran darah perifer dan serebral untuk merangsang terjadinya angiogenesis dan neurogenesis di hipokampus.

Kemampuannya bereaksi secara langsung dengan dan agen neurotoksis dan pro-inflamasi yang diproduksi oleh otak yang normal maupun abnormal (Spencer, 2010).

D. METABOLISME, ABSORPSI DAN BIOAVAILIBILITAS ANTOSIANIN

Antosianin setelah dikonsumsi terdeteksi secara sistemik dalam beberapa bentuk, antara lain konjugasi sulfat, alkoholat, glukuronat, dan glikosilasi (Manach *et al.* 2005). Metabolisme oleh mikroflora usus menghasilkan sejumlah besar asam fenolat dan metabolit aldehid dengan berbagai karakteristik struktural dari antosianin yang lebih stabil. Metabolisme antosianin di usus kecil menyebabkan hubungan glikosida dihidrolisis menghasilkan bentuk aglikon. Antosianin dan aglikon yang tidak diserap di usus kecil kemudian diteruskan ke usus besar untuk dimetabolisme lebih lanjut oleh mikroflora residen. Antosianin yang diinkubasi mikroflora usus menyebabkan degradasi antosianin menghasilkan pembentukan asam fenolik dan metabolit aldehida universal. Asam fenolik hasil hidrolisis cincin-B sebagian besar mempertahankan strukturnya setelah pemisahan dari kerangka antosianin. Metabolit asam fenolik dapat dimodifikasi lebih lanjut oleh glukuronidasi. Metabolit asam fenolik dari antosianin berbasis sianidin yaitu asam protocatechuic (PCA) ditemukan dalam sirkulasi, mencapai konsentrasi delapan kali lebih tinggi daripada induk antosianin dalam plasma tikus (Woodward *et al.*, 2009).

Antosianin setelah konsumsi dengan cepat akan diserap ke dalam aliran darah menuju jaringan target termasuk pada SSP. Proses ini dimediasi oleh transporter bilitranslocase yang mengikat bilirubin pada sel endotel BBB. Ikatan antara antosianin dan bilirubin terjadi karena ikatan hidrogen yang tidak berubah yang memungkinkan terjadinya mekanisme transport ini (Karawjczyk *et al.*, 2007). Antosianin dapat juga berinteraksi dengan transporter p-glikoprotein untuk memasuki SSP. Antosianin berakumulasi pada jaringan otak tikus dengan kadar 0,21 nmol/g jaringan. Akumulasi terjadi di beberapa jaringan termasuk sel endotel dan parenkim otak pada striatum, hippocampus, cerebellum, dan korteks (Youdim *et al.* 2003)

Antosianin adalah suatu polifenol yang menarik perhatian untuk dikembangkan sebagai terapi dan pencegahan penyakit neurodegeneratif. Antosianin relatif hidrofilik, dibandingkan dengan antioksidan lainnya tetapi antosianin bisa melewati sawar darah otak dan masuk ke SSP. Distribusi antosianin di jaringan otak berbeda karena faktor perbedaan pengantarannya, metabolisme dan retensi jaringan otak. Area otak yang banyak mengandung antosianin (3-glukosid) adalah korteks, serebelum, batang otak dan diensefalon (Milbury and Kalt, 2010).

Antosianin secara umum mempunyai stabilitas yang rendah. Pada pemanasan yang tinggi, kestabilan dan ketahanan zat warna antosianin akan berubah dan mengakibatkan kerusakan. Selain mempengaruhi

warna antosianin, pH juga mempengaruhi stabilitasnya, antosianin lebih stabil dalam suasana asam dibandingkan dalam suasana alkalis ataupun netral. Pada umumnya, zat-zat warna distabilkan dengan penambahan larutan buffer yang sesuai. Jika zat warna tersebut memiliki pH sekitar 4 maka perlu ditambahkan larutan buffer asetat, demikian pula zat warna yang memiliki pH yang berbeda maka harus dilakukan penyesuaian larutan buffer. (Hambali *et al.*, 2014).

E. ANTOSIANIN PADA EKSTRAK AIR UBI JALAR UNGU

Antosianin adalah pigmen alami yang banyak terdapat pada buah-buahan dan sayuran. Kandungan antosianin berbeda pada beberapa tanaman per 100 gramnya seperti *blueberries* mengandung 330 mg, *chokeberries* 660 mg, buah kemiri 500 mg, buncis 790 mg, coklat 1630 mg, gandum 1900mg, bunga anggur 3500 mg dan kayu manis 8100mg. Ubiunggi kulvitar bali mengandung 157 mg/100 gr (Gu *et al.*, 2004; Suprpta *et al.*, 2004). Pigmen warna merah, orange dan ungu yang menyebabkan industri farmasi tertarik untuk membuat sebagai industri makanan. Antosianin yang terdapat pada tumbuhan adalah pelargonidin, sianidin, delphinidin, petunidin dan malvidin. Antosianin juga terdapat pada kacang, sayuran dan buah-buahan. Antosianin yang terdapat pada kedelai hitam banyak mengandung *cyanidine-3-glucoside* (C3G) bisa melewati sawar darah otak dan mempunyai efek anti oksidan, sehingga bisa melindungi otak dari stres oksidatif (Kang *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009).

Ubi jalar (*Ipomea batatas*) merupakan tanaman yang diyakini berasal dari Benua Amerika dan telah tersebar hampir di seluruh dunia. Umbi dari tanaman ubi jalar merupakan salah satu dari sumber karbohidrat penting di Asia termasuk Indonesia. Seperti halnya kulit umbi maka daging ubi jalar juga beragam warnanya, yaitu putih, kuning, oranye, merah, atau ungu (Andarwulan *et al.*, 2012). Akarnya yang disebut dengan ubi ungu banyak digunakan sebagai obat tradisional. Akar dan kulitnya banyak mengandung polifenol seperti antosianin dan asam fenolat merupakan sumber vitamin A, B, C, Fe, Ca dan fosfor. Warna ungu pada ubi jalar disebabkan karena ubi tersebut banyak mengandung antosianin. (Suprpta *et al.*; 2004, Panda *et al.*, 2012). Bentuk antosianin yang banyak dikandung oleh ubi jalar ungu adalah bentuk sianidin dan peonidin. Sekitar 80% dari total antosianin tersebut berada dalam bentuk terasilasi (Fan G *et al.*, 2008).

Kadar antosianin yang tinggi pada ubi jalar ini menyebabkan stabilitasnya yang lebih tinggi dibandingkan dengan antosianin dari sumber yang lain. Di Indonesia dikenal beberapa varietas ubi jalar ungu yaitu MSU 01022-12, MSU 03028-10, dan RIS03063-05. Varietas MSU 0328-10 mempunyai kadar antosianin lebih tinggi dari ubi jalar ungu dari Jepang yaitu 560 mg/100g (Jusuf *et al.*, 2011). Di Bali ditemukan varietas ubi jalar ungu, diantara jenis umbi yang paling banyak mengandung antosianin adalah ketela rambat ungu kecil kulit putih (110,51 mg/100grm) dan ketela ungu kulit putih (209,8 mg/100gram) (Suprpta *et al.*, 2004).



Gambar 2.13 Ekstrak dan Ubi Jalar Ungu Varietas Bali

Antosianin adalah salah satu antioksidan natural yang terdapat pada ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L) yang pertama kali dikembangkan di Jepang. Antosianin merupakan suatu senyawa polifenol gugus flavonoid, yang relatif hidrofilik dibanding antioksidan lainnya. Beberapa temuan menunjukkan bahwa antosianin memperbaiki kerusakan akibat proses neurodegenerasi seperti stres oksidatif, eksitotoksisitas, inflamasi pada glia, agregasi protein, dan induksi protein pada sinyal apoptosis. Antosianin mampu melewati sawar darah otak dengan menunjukkan efek langsungnya pada neuron yang mengalami kematian di susunan saraf pusat (SSP) pada penyakit Alzheimer (Youdim *et al.*, 2003). Efek antioksidan antosianin melalui mekanisme mencegah pembentukan radikal bebas dengan enzim xanthine oksidase dan khelasi metal; mendonorkan elektron dan menangkap radikal bebas, menghambat proses propagasi reaksi oksidatif, dan menginduksi ekspresi antioksidan endogen (Montilla *et al.*; 2010; de Pascual-Teresa, 2014). Modulasi jalur sinyal proinflamasi oleh antosianin dinilai dari tingkat aktivasi *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK), *p38-mitogen activated protein kinase* (p38-MAPK), *ekstraseluler signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2) dan Akt yang menurun secara signifikan. Pengurangan aktivitas jalur sinyal ini berkorelasi dengan berkurangnya aktivasi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan mencegah translokasinya ke nukleus, yang dapat memediasi transkripsi gen pro-inflamasi (Poulose *et al.*, 2012).

Bentuk antosianin yang banyak dikandung oleh ubi jalar ungu adalah bentuk sianidin dan peonidin. Kadar antosianin yang tinggi pada ubi jalar ungu menyebabkan stabilitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan antosianin dari sumber lain. Kandungan antosianin dari umbi ubi jalar ungu yang dibudidayakan di Bali berkisar antara 110 mg/100 gram sampai 210 mg/100 gram (Suprpta *et al.*, 2004). Ekstrak ubi jalar ungu kultivar Bali yang mengandung antosianin telah diteliti oleh Jawi *et al.* (2008) pada mencit yang diinduksi diabetes dengan injeksi streptozotocin ternyata dapat menurunkan kadar MDA yang merupakan

petanda oksidasi lipid, meningkatkan kadar SOD dan Nrf2. Penelitian lainnya menyimpulkan ekstrak ubi jalar ungu kultivar Bali dapat menekan apoptosis disertai kadar kaspase 3 dan sitokrom lebih rendah serta kadar Bcl-2 lebih tinggi pada tikus Wistar dengan stroke iskemik (Adnyana, 2017). Pemberian ekstrak ubi jalar ungu pada tikus model penuaan D-galaktosa dapat menekan aktivasi protein pro-apoptosis seperti JNK selain itu juga mencegah pelepasan sitokrom c mitokondria dan pelaksanaan selanjutnya dari jalur sinyal apoptosis (Lu *et al.*, 2010, Ye *et al.*, 2010).

F. EFEK ANTIOKSIDAN DARI ANTOSIANIN

Otak memiliki berat kurang lebih 2% dari total massa tubuh dan mengkonsumsi sekitar 20% oksigen yang tersedia melalui respirasi. Akibat kebutuhan oksigen yang tinggi maka otak merupakan organ yang paling rentan terhadap kerusakan oksidatif. Ada banyak bukti bahwa stres oksidatif berperan penting dalam patogenesis penyakit yang terkait usia atau neurodegeneratif. Stres oksidatif disebabkan oleh ketidakseimbangan antara produksi dan eliminasi ROS dalam sistem biologis. Akibatnya akan terjadi kerusakan oksidatif pada morfologi dan fungsi dari sel maupun jaringan yang mengakibatkan penuaan dan kematian sel. Penurunan memori dan fungsi kognitif dianggap sebagai konsekuensi dari gangguan neurodegeneratif dan penuaan yang terkait usia (Domenico *et al.*, 2017).

Tingginya jumlah asam lemak tak jenuh ganda dalam membran saraf membuat jaringan otak juga sangat rentan terhadap reaksi peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan salah satu sumber utama injuri dimediasi radikal bebas yang secara langsung merusak membran dan menghasilkan sejumlah produk sekunder seperti *malondialdehyde* (MDA), *4-hidroksinonenal* (4-HNE), akrolein dan lain-lain. Sel glia pada otak penderita Alzheimer memerlukan lebih banyak oksigen dan glukosa agar dapat memasok suplai *adenosin triphospat* (ATP) untuk menjaga fungsi normal otak. Neuron juga sangat sensitif terhadap ROS karena komposisi biokimianya terdiri dari asam lemak yang tinggi sehingga rentan terjadi peroksidasi lipid. Pembentukan MDA terjadi secara endogen selama proses stres oksidatif intraseluler, bersifat lebih stabil dan reaksinya dengan *deoxyribonucleic acid* (DNA) bisa menjadi biomarker kerusakan DNA endogen. MDA dilepaskan ke ruang ekstraseluler dan masuk ke dalam peredaran darah sehingga menilai kadar MDA dalam plasma darah atau jaringan merupakan salah satu cara untuk memprediksikan stres oksidatif (Singh *et al.*, 2014).

Antosianin sama seperti flavonoid lainnya merupakan antioksidan unik karena dapat menghancurkan ROS dan RNS secara langsung, yang bisa dinilai dari tingginya kapasitas absorpsi dari radikal oksigen (ORAC) dan peningkatan pertahanan antioksidan intrinsik dari sel (Hwang *et al.*, 2011). Antosianin memberikan perlindungan kuat dari toksisitas hidrogen peroksida dalam berbagai jalur sel saraf. Superoksida dan hidrogen peroksida terdapat pada proses fisiologis, dan semakin meningkat akibat proses neurodegenerasi karena terjadi disfungsi mitokondria dan inflamasi glial. Antosianin mampu menghancurkan ROS sehingga tepat untuk kondisi kerusakan oksidatif pada penyakit Alzheimer (Poulose

et al. 2016).

Perbaikan tidak langsung stres oksidatif dan nitrosatif oleh antosianin dengan melalui peningkatan kadar aktivitas enzim antioksidan yaitu enzim katalase antara lain hidrogen peroksida dan SOD1 baik in vitro dan in vivo. Antosianin juga meningkatkan kadar GSH dengan meningkatkan aktivitas glutathione peroxidase, yang berperan dalam detoksifikasi hidrogen peroksida. Selain itu antosianin terbukti mengurangi stres oksidatif dan disfungsi mitokondria dengan inhibisi Bcl-2. Efek neuroprotektif dari anthocyanin dimediasi melalui aktivitas antioksidan langsung dan tidak langsung dalam otak (Kelsey *et al.* 2011). Efek antioksidan sangat tergantung pada gugus hidroksil pada cincin B. Efek antioksidan antosianin adalah melalui mekanisme: 1) Mencegah pembentukan radikal bebas dengan enzim xanthine oksidase dan khelasi metal; 2) Mendonorkan elektron dan menangkap radikal bebas, 3) Menghambat proses propogasi reaksi oksidatif, 4) Menginduksi ekspresi antioksidan endogen (Montilla *et al.*; 2010; de Pascual-Teresa, 2014).

G. EFEK ANTI INFLAMASI DARI ANTOSIANIN

Deposit A β mengaktivasi respon imun akut dari sel mikroglia dan astrosit. Secara bersamaan plak A β juga memproduksi dan mengaktivasi protein yang terkait inflamasi seperti faktor komplemen, protein fase akut, kemokin dan sitokin. Peningkatan sitokin erat kaitannya dengan aktivasi mikroglia akibat paparan agregasi A β . Sitokin yang terlibat dalam proses neuroinflamasi kronis pada DA diantaranya adalah *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) yang merupakan sitokin utamadalam memulai respons inflamasi(Meraz-Rios *et al.*, 2013). Peningkatan kadar TNF- α pada jaringan otak mencit DA transgenik dikaitkan dengan immunoreaktivitas A β pada neuron korteks entorhinal. Peran pensinyalan TNF- α juga dilaporkan saat pemrosesan *amyloid precursor protein* (APP) abnormal, akumulasi plak A β , protein taupatologis, dan kematian sel. Peningkatan kadar TNF- α di otak dapat menghambat klirens A β pada mikroglia, menyebabkan disfungsi sinaptik dan menimbulkan kematian neuron yang luas sehingga mempercepat penurunan fungsi kognitif (Chang *et al.*, 2017).

Antosianin mampu mengurangi induksi protein pro-inflamasi seperti iNOS dan COX-2 sebagai respons terhadap stimulasi dengan lipopolisakarida (LPS), komponen dinding sel bakteri yang diketahui menginduksi respon inflamasi yang nyata. Ekstrak kaya antosianin secara signifikan mengurangi produksi dan sekresi oksida nitrat, IL-1 β dan TNF- α Modulasi jalur sinyal proinflamasi oleh antosianin dinilai dari tingkat aktivasi *c-Jun-N-terminal kinase* (JNK), *p38-mitogen activated protein kinase* (p38-MAPK), *ekstraseluler signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2) dan Akt yang menurun secara signifikan. Pengurangan aktivitas jalur sinyal ini berkorelasi dengan berkurangnya aktivasi *nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dan mencegah translokasinya ke nukleus, yang dapat memediasi transkripsi gen pro-inflamasi(Poulose *et al.*, 2012).

Penelitian pada tikus yang mendapat antosianin dari ubi ungu setelah injeksi dengan LPS menunjukkan penurunan tajam penanda neuroinflamasi (Wang *et al.*, 2010). Kadar iNOS dan COX-2 secara signifikan menurun pada otak tikus yang diberi antosianin, disertai adanya peningkatan signifikan dalam tugas kognisi dan memori. Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak kaya antosianin dari kedelai hitam secara efektif mengurangi inflamasi pada tikus model penuaan yang diinduksi dengan D-galaktosa (Poulose *et al.*, 2016, Rehman *et al.*, 2016). Terdapat penurunan secara signifikan kadar NOX-2, penurunan tingkat aktivitas iNOS dan NF- κ B, serta penurunan produksi TNF- α dan ROS, dan peroksidasi lipid. Penelitian ini

melaporkan penurunan kadar astrosit reaktif dan mikroglia aktif pada jaringan hipokampus tikus yang diberi antosianin (Rehman *et al.*, 2016).

Studi *in vivo* menunjukkan bahwa antosianin mempunyai efek anti inflamasi yang bermakna. Seperti contoh pada tikus yang diberikan lipopolisakarida, ternyata antosianin dari ubi ungu secara bermakna menekan efek lipopolisakarida untuk mengekspresikan COX, iNOS, TNF-alpha, IL-1 β , IL-6 pada otak tikus (Wang *et al.*, 2010). Antosianin yang diekstrak dari ubi jalar manis berwarna ungu mempunyai efek menekan ekspresi iNOS dan COX-2 pada liver tikus yang diinduksi dengan dimetilnitrosamin (Hwang *et al.*, 2011).

Penelitian antosianin yang diekstrak dari ubi jalar ungu kultivar Bali, pada mencit yang mengalami stres oksidatif, dapat menurunkan kadar *malondialdehyde* (MDA), yang merupakan suatu pertanda oksidasi lipid pada membran atau organ (Jawi *et al.*, 2008). Penelitian oleh Jawi *et al.*, (2012a) memperlihatkan ekstrak ubi jalar ungu yang mengandung antosianin pada tikus yang diberikan streptozotocin untuk menginduksi terjadinya diabetes melitus, terdapat peningkatan total kadar antioksidan yang bermakna ($p < 0,05$) pada tikus yang diberikan ekstrak ubi jalar ungu, serta terjadi perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) peningkatan glukose darah dan kadar MDA pada tikus yang tidak diberikan ekstrak ubi jalar ungu.

Ekstrak ubi jalar ungu kultivar Bali juga mempunyai efek antihipertensi dan peningkatan ekspresi eNOS pada tikus yang diinduksi hipertensi (Jawi *et al.*, 2012b). Efek ekstrak ubi jalar ungu terhadap proteksi stres oksidatif pada endotel aorta kelinci diteliti oleh Jawi *et al.* (2014). Hasil dari penelitian ini adalah terjadi peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) kadar SOD-2, NRF2, dan penurunan yang bermakna ($p < 0,05$) kadar *vascular celluler adhesion molecule-1* (VCAM-1).

H. EFEK ANTI APOPTOSIS DARI ANTOSIANIN

Efek antosianin pada apoptosis dengan mempengaruhi sinyal protein yang merangsang terjadinya pertumbuhan dan mengatur jalur apoptosis yang tergantung dan tidak tergantung dari kaspase (Reddivari *et al.*, 2007). Pemberian ekstrak ubi jalar ungu pada tikus model penuaan D-galaktosa dapat menekan aktivasi protein pro-apoptosis seperti JNK selain itu juga mencegah pelepasan sitokrom c mitokondria dan pelaksanaan selanjutnya dari jalur sinyal apoptosis (Lu *et al.*, 2010, Ye *et al.*, 2010). Efek ini dimediasi oleh aktivasi phosphoinositide-3-kinase (PI3K), yang merupakan aktivator hulu Akt sebagai pengatur utama sinyal pro-survival. Anthocyanin mampu memodulasi ekspresi anggota keluarga Bcl-2. Antosianin mencegah pelepasan *Apoptosis-inducing factor* (AIF) dari mitokondria yang merupakan jalur apoptosis tidak tergantung pada kaspase (Min *et al.*, 2011).

Jumlah sel hipokampus dan korteks serebri yang mengalami apoptosis meningkat pada tikus yang diberikan D-galaktose, tetapi pada tikus yang diberikan D-galaktose dan antosianin dari ekstrak ubi ungu ternyata jumlah sel hipokampus dan korteks yang mengalami apoptosis lebih rendah secara bermakna ($p < 0,001$). Juga terjadi penurunan aktivasi kaspase-3 yang diperiksa dengan western blotting pada otak tikus yang diberikan ekstrak ubi ungu ($p < 0,001$) (Lu, *et al.*; 2010).

Berdasarkan efek antosianin seperti disebutkan oleh peneliti diatas yang mempunyai efek anti oksidan dan anti inflamasi sehingga memberi perlindungan terjadinya apoptosis, maka penulis ingin meneliti ekstrak ubi jalar ungu terhadap stress oksidatif, inflamasi dan apoptosis.

I. TERAPI FARMAKOLOGIS PADA DEMENSIA ALZHEIMER

Terapi farmakologi AD selama ini lebih ditekankan pada pemberian inhibitor kolinesterase. Terdapat empat agen yang sudah terbukti melalui uji klinis untuk terapi pada AD yaitu donepezil, rivastigmin, galantamin dan memantin. Mekanisme kerja inhibitor kolinesterase ini adalah dengan mencegah pemecahan asetilkolin yang merupakan neurotransmitter penting untuk fungsi memori dengan mem-blok enzim asetilkolinesterase (Ong *et al.*, 2015).

Obat golongan *disease modifying agents* antara lain obat anti inflamasi non steroid, preparat estrogen, vitaminE dan selegiline, namun masih terdapat beberapa kontroversi terhadap penggunaan agen ini. Obat anti inflamasi non steroid dikatakan dapat menunda keluhan dan mengubah tampilan demensia Alzheimer. Sitokin inflamasi akibat proses inflamasi ditemukan dalam jumlah banyak pada plak senilis. Penggunaan indometasin memperlihatkan sedikit perbaikan kognitif dibanding plasebo. Estrogen terbukti memperbaiki aliran darah ke otak melalui efek langsung pada endotel dan merangsang faktor pertumbuhan saraf pada neuron kolinergik. Uji klinik dalam jumlah terbatas memperlihatkan keuntungan estrogen dalam terapi demensia Alzheimer. Namun, belum ada bukti yang menyokong pemakaian estrogen untuk memperbaiki gejala kognitif. Vitamin E dapat dipertimbangkan sebagai terapi demensia Alzheimer, walaupun masih diperlukan penelitian lebih lanjut yang dapat meningkatkan ADL dan tingkat survival pasien demensia Alzheimer (Ong *et al.*, 2003).

Adanya minat pada aspek imunologi dari patofisiologi AD, maka timbul usaha-usaha untuk menemukan target terapi baru selain dari inhibitor kolinesterase. Sebagian besar studi dilakukan pada pasien Mild Cognitive Impairment (MCI) dan AD dengan tujuan menemukan agen yang efektif dan efisien sebagai pencegahan penyakit ini. Beberapa agen mungkin bahkan hanya efektif sebagai agen preventif. Sebuah uji klinis bernama ADAPT (Alzheimer's Disease Anti-inflammatory Prevention Trial) dilakukan pada penderita dengan stadium awal dengan menggunakan COXinhibitor naproksen dan COX-2 inhibitor celecoxib. Sebuah studi *follow-up* menunjukkan kemungkinan efek protektif naproksen pada subyek dengan kognitif yang masih intak, namun studi lanjutan pada tahun 2013 justru menunjukkan tidak ada efek dalam penundaan waktu menuju diagnosis DA. Sehingga secara teoritis disimpulkan bahwa COX bukanlah mediator kunci dalam proses neuroinflamasi pada DA (Heneka *et al.*, 2015).

Obat-obat yang mempengaruhi fungsi mikroglia dan inflamasi sistemik, seperti TNF- α blocker

etanercept, juga sedang dalam penelitian sebagai agen terapi untuk DA. Sebuah studi acak, kontrol dengan plasebo, *double-blind*, fase 2 pada pasien dengan DA ringan sampai sedang menggunakan etanercept, menunjukkan peningkatan fungsi kognitif, fungsional dan behavioural. Peranan imunitas dan inflamasi pada patofisiologi DA membuka banyak peluang untuk area penelitian target terapi maupun agen preventif pada DA (Butchart *et al.*, 2015).

Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa senyawa flavonoid mungkin efektif dalam mencegah onset dan memperlambat perkembangan DA. Akibat kegagalan pengembangan obat farmasi konvensional untuk terapi modifikasi DA maka dikembangkan strategi alternatif untuk mengurangi beban penyakit pada DA. Sejumlah penelitian kini telah dilakukan menunjukkan flavonoid menjanjikan dalam pencegahan DA. Metabolisme APP dalam hipotesis kaskade amyloid merupakan target langsung flavonoid pada perkembangan DA (Williams and Spencer, 2012). Penelitian sebelumnya telah menemukan pemberian flavonoid dengan minum dalam jumlah tinggi teh hijau yang kaya flavonoid menunjukkan bahwa teh hijau dapat memperbaiki efek kognitif dari penyakit Alzheimer, termasuk gangguan memori dan kemampuan referensi. Studi lain menemukan bahwa antioksidan dalam teh hijau mengurangi stres oksidatif pada otak yang disebabkan oleh penumpukan plak beta-amyloid.

J. PEMBUATAN DAN PEMBERIAN EKSTRAK UBI UNGU PADA TIKUS MODEL DEMENSIA

Pembuatan ekstrak ubi ungu dikerjakan di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Universitas Udayana. Ekstrak air dibuat dengan prosedur sebagai berikut:

Ubi jalar ungu didapat dari petani dicuci dengan air bersih kemudian dikupas kulitnya, dipotong melintang dengan ketebalan 2-2,5 cm. Potongan ubi jalar tersebut dicampur dengan air bersih dengan perbandingan 1 kg ubi jalar ditambah 1 liter air, kemudian diblender dan disaring dengan 3 lapis kain kasa. Cairan yang diperoleh dari penyaringan tersebut dipanaskan hingga mendidih selama 30 menit untuk sterilisasi (Jawi *et al.*, 2016).

Tikus model demensia diinduksi dengan injeksi D-galaktosa intra peritoneal dosis 100 mg/kg/hari selama 8 minggu. Tikus dipegang dengan menjepit kepala menggunakan ibu jari dan telunjuk, ekornya dijepit antara jari manis dan kelingking dalam posisi terlentang dengan posisi kepala lebih rendah dari abdomen. Setelah melakukan desinfeksi dengan alcohol 70%, injeksi intraperitoneal D-galaktosa dilakukan pada daerah kuadran bawah abdomen agak lateral dari garis tengah, kearah kepala dengan sudut 10 derajat. Penyuntikan dilakukan setiap hari dengan mengubah sisi yang disuntikkan antara kanan dan kiri.

Tikus model demensia diberikan ekstrak ubi ungu kultivar Bali yang dibuat di Laboratorium Teknologi Hasil Pertanian Universitas Udayana. Pemberian ekstrak ubi ungu pada kelompok perlakuan dengan dosis 200 mg/kgBB secara oral melalui *nasogastric tubes* satu kali setiap hari pada jam 08.00 pagi selama 8 minggu setelah pemberian injeksi D-galaktosa 100mg/kg secara intraperitoneal.

DAFTAR PUSTAKA

- Banji, O.J., Banji, D., Ch, K., 2014. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food Chem. Toxicol.* 74, 51–59.
- Butchart. J., Brook, L., Hopkins, V., Teeling, J., Puntener, U., Culliford, D., et al. 2015. Etanercept in Alzheimer disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Neurology*;84:2161–8.
- De Pascual-Teresa, S. 2014. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*; 559: 68-74.
- Deacon, R.M.J., Rawlins, N.P. 2006. T-Maze Alternation in Rodent. *Nature Protocols.* 1, 7-12
- Du, X., Wang, X., Geng, M. 2018. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. *Translational Neurodegeneration.* 7:2 DOI 10.1186/s40035-018-0107y
- Fan, G., Han, Y., Gu, Z., Gu, F. 2008. Composition and colour stability of anthocyanins extracted from fermented purple sweet potato culture. *Food Sci. Technol.* 41: 1412-1416
- Huang, W.J., Zhang , X., Chen, W.W. 2016 "Role of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease (Review)". *Biomedical Reports.* 4:519-522.
- Hwang, Y.P., Choi, J.H., Choi, J.M., Chung, Y.C., Jeomg, H.G. 2011. Protective mechanisms of anthocyanin from purple sweet potato against tert-butyl hydroperoxide induced hepatotoxicity. *Food Chem Toxicol*; 49: 93-99.
- Kelsey, N., W. Hulick, A. Winter, E. Ross, and D. Linseman. 2011. "Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress." *Nutr Neurosci* 14 (6):249-59
- Kumar, A., Aggarwal, A., Singh, A. 2016. Animal Models in Drug Discovery of Alzheimer's Disease: A Mini Review. *EC Pharmacology and Toxicology.* 2.1: 60-79
- Lu, J., D. M. Wu, Y. L. Zheng, B. Hu, and Z. F. Zhang. 2010. "Purple sweet potato color alleviates D-galactose-induced brain aging in old mice by promoting survival of neurons via PI3K pathway and inhibiting cytochrome C-mediated apoptosis." *Brain Pathol* 20 (3):598-612.
- Mateus N., de Freitas V. 2009. Anthocyanins as food colorants. In: Gould K, Davies K, Winefield C (eds). *Anthocyanins. Biosynthesis, Functions, and Applications.* New York: Springer
- Montilla, E.C., Hillebrand, S., Winterhalter P. 2011. Anthocyanin in Purple sweet Potato (*ipomoea batatas* L) varieties. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*; 5(2): 19-24

- Odake, K., Terahara, N., Saito, N., Toki, K., Honda, A.T. 1992. Chemical structures of two anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas*. *Phytochem.*31(6):2127- 2130.
- Panda, V., Sonkambe, M. 2012. Phytochemical constituents and pharmacological activities of *ipomoea batatas* L. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol*; 2(1): 25-34.
- Rehman, S.U., et al., 2017. Anthocyanins reversed D-galactose-induced oxidative stress and Neuroinflammation mediated cognitive impairment in adult rats. *Mol. Neurobiol.* 54, 255–271.
- Sharma, S., Rakoczy, S., Brown-Borg, H. 2010. Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences.* 87, 521-536
- Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., Van Eldik, L.J. 2014. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioural changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics*; 5;88.
- Williams,R.J., Spencer, J.P. 2012. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med* 52:35-45.
- Woodward, G., Kroon, P., Cassidy, A., and Kay,C. 2009. "Anthocyanin stability and recovery: implications for the analysis of clinical and experimental samples." *J Agric Food Chem* 57 (12):5271-8.
- Wright, R.L., Conrad, C.D. 2005. Chronic stress leave novelty-seeking behaviour intact while impairing spatial recognition memory in the Y-Maze. *Stress.* 8, 151-154
- Youdim, K. A., Dobbie, M. S., Kuhnle, G., Proteggente,A. R., Abbott, N. J., and Rice- Evans,C. 2003. "Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies." *J Neurochem.* 85 (1):180-92.