



PROSIDING

SEMINAR NASIONAL KIMIA DAN PENDIDIKAN KIMIA III

"Teori dan Aplikasi Sains dalam Isu Globalisasi Lingkungan, Profesionalisasi Pembelajaran dan Kewirausahaan"



Program Studi Pendidikan Kimia Jurusan PMIPA FKIP UNS

Surakarta, 7 Mei 2011

MAKALAH PENDAMPING

KIMIA ORGANIK
(Kode : E-09)

ISBN : 978-979-1533-85-0

BIOASSAY POLIFENOL SARANG LEBAH MADU (*Trigona spp*) SEBAGAI BLOKING PENGARUH PESTISIDA DITINJAU DARI KADAR MDA (MALONDIALDEHID) PADA MARMUT

Silvia Andini^{1,*} dan Menur Niken Anggraeni²

¹ Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, Indonesia (silvia_cocil@yahoo.com)

² Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga, Indonesia (coralinemaria@yahoo.co.id)

Abstrak

Masyarakat menyadari bahwa tingkat pencemaran di sekitarnya, termasuk makanan yang dikonsumsi, sudah cukup tinggi. Dalam hal buah dan sayur, cemaran pestisida sulit dihindari sehingga diperlukan suatu terobosan yang dapat menjadi salah satu solusi alternatif untuk menghambat pengaruh pestisida yang mencemari buah dan sayur tersebut. Salah satu sumber yang masih kurang dimanfaatkan namun berpotensi adalah sarang lebah madu. Sarang lebah madu memiliki aktivitas antioksidan karena keberadaan senyawa polifenol. Polifenol mampu mengais superoksida dan hidroksil radikal yang dihasilkan oleh HCH (*hexachlorocyclohexane*) yang umum dijumpai dalam pestisida. Polifenol menunjukkan efek perlindungan terhadap HCH yang disebabkan stres oksidatif karena peningkatan kadar MDA (malondialdehid). Studi ini bertujuan untuk menentukan kadar polifenol pada sarang lebah dan menentukan kapasitas polifenol sebagai bloking pestisida ditinjau dari kadar MDA pada marmut. Lipida sarang lebah madu diekstraksi menggunakan metode soxhlet dengan dua pelarut, yaitu heksana (p1) dan etil asetat (p2), dan diperoleh rendemen berturut-turut 51,14% dan 69,90%. Selanjutnya dilakukan ekstraksi total polifenol yang terdapat pada lipida sarang lebah dengan metode Xia (1998), menghasilkan kadar 0,68% (p1) dan 1,18% (p2). Sebanyak 75 ekor marmut dewasa dibagi dalam 15 kelompok. Tiga kelompok sebagai kontrol, enam kelompok diberi ekstrak polifenol (p1) dan enam kelompok diberi ekstrak polifenol (p2). Pemberian pestisida dan ekstrak pada marmut dilakukan sekali kemudian diukur kadar MDA yang dieksresikan pada urin marmut selama 7 hari berturut-turut menggunakan metode Ichimoto (1995). Penurunan kadar MDA dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut heksana paling efektif adalah pada hari ketiga, yaitu 49,18% (250 mg/kg b.b) dan 55,02% (500 mg/kg b.b). Sedangkan dengan pelarut etil asetat paling efektif adalah pada hari keenam, yaitu 90,28% (250 mg/kg b.b) dan 91,47% (500 mg/kg b.b).

Kata Kunci: sarang lebah madu, polifenol, residu pestisida, malondialdehid (MDA)

PENDAHULUAN

Pestisida adalah bahan yang digunakan untuk mengendalikan, menolak, atau memusnahkan organisme pengganggu. Senyawa yang banyak digunakan dalam pestisida dan obat untuk keperluan pertanian adalah HCH (*hexachlorocyclohexane*). Senyawa ini dapat masuk ke dalam sistem hewan maupun manusia, baik secara langsung melalui inhalasi atau dermal kontak dan secara tidak langsung melalui rantai makanan kemudian terakumulasi dalam jaringan

adiposa serta *bilayer* membran semua sel karena sifatnya yang lipofilik. Beberapa penelitian menemukan hubungan pestisida sebagai pencetus timbulnya kanker, penurunan tingkat kesuburan, dan gangguan sistem kekebalan tubuh [1]. Hal ini dimungkinkan karena selain sifatnya yang toksik, HCH terakumulasi dalam jaringan adiposa, di mana jaringan adiposa ini rentan terhadap proses oksidasi yang dapat menghasilkan radikal peroksida. Radikal peroksida kemudian dapat bereaksi rantai dengan HCH menghasilkan radikal-

radikal yang lebih reaktif dan membahayakan keberadaan biomolekul penting dalam sel.

Telah lama diketahui bahwa radikal bebas berpengaruh buruk dan dapat menyebabkan kerusakan pada komponen sel, seperti lipid, protein, dan asam nukleat serta dapat menyebabkan mutasi sel yang bersifat karsinogenik. Tingkat kerusakan pada sel akibat radikal bebas dapat ditentukan dengan mengukur kadar MDA (malondialdehid) [2]. MDA tersusun dari 3 atom karbon yang mempunyai rumus $C_3H_4O_2$, di mana kelompok karbonil terletak pada posisi C_3 dan C_1 . MDA merupakan senyawa toksik terhadap sistem kehidupan karena kemampuannya untuk mengubah atau berikatan silang dengan berbagai macam biomolekul, seperti enzim, protein, lipoprotein, aminofosfolipid dan asam amino [3].

Dalam lilin lebah terkandung polifenol yang dapat berfungsi sebagai antioksidan, antiapoptosis, *anti-aging*, antikarsinogen, dan sebagainya. Polifenol lilin lebah dilaporkan mampu menekan toksisitas karbon tetraklorida dan parasetamol pada tikus. Ekstrak yang digunakan dalam studi tersebut menunjukkan kemampuan polifenol mengais oksigen singlet dan menghentikan peroksidasi, sehingga dianggap sebagai penangkal radikal bebas [4].

Hal ini yang mendorong penulis untuk melakukan penelitian mengenai potensi polifenol lilin lebah sebagai blocking pengaruh pestisida ditinjau dari penurunan kadar MDA. Pengujian biologis dilakukan pada marmut. Jika kadar polifenol, yang didasarkan pada berat badan marmut, yang digunakan pada percobaan terbukti dapat menghambat pengaruh pestisida maka polifenol dari sarang lebah akan berpotensi pula kebermanfaatannya bagi manusia jika polifenol yang dikonsumsi berdasarkan berat badan manusia.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan dari studi ini adalah menentukan kadar fenolik total pada sarang lebah dan kapasitas polifenol sebagai blocking pestisida terhadap kadar MDA pada marmut.

PROSEDUR PERCOBAAN

Bahan dan Piranti

Sarang lebah madu bekas panen yang digunakan diperoleh dari peternak lebah madu di Kopeng, Kabupaten Semarang, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan adalah heksana teknis, etil asetat teknis, etanol 80%, eter, Na_2SO_4 teknis, akuades, asam asetat, asam galat standar, reagen folin ciocalteau, Na_2CO_3 teknis, karbon aktif, TBA, NaOH PA.

Piranti yang digunakan adalah cawan penguap, desikator, oven, neraca Mettler H-80, piranti soxhlet, kolf, *rotary evaporator*, piranti gelas, spektrofotometer Shimadzu UV-Vis mini 1240, corong pisah, sentrifuse.

Ekstraksi Polifenol dari Sarang Lebah Madu

Sarang lebah madu dari golongan lebah klanceng (*Trigona spp*) diekstraksi dengan 2 macam pelarut, yaitu heksana dan etil asetat masing-masing sebanyak 2 sirkulasi hingga pelarut bening. Kemudian masing-masing hasil ekstraksi diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh lilin lebah (*bees wax*).

Polifenol didapatkan dari ekstraksi dari lilin lebah dengan mengacu pada metode yang dilakukan oleh Xia dkk. (1998) [5]. 300 gram lilin lebah dari masing-masing ekstraksi diberi etanol 80% dengan perbandingan 1:2 (b:v), kemudian didiamkan selama 5 hari pada suhu ruang. Setelah 5 hari filtrat diuapkan dengan *rotary evaporator*, endapan dilarutkan dengan sedikit akuades kemudian dituang pada corong pisah. Larutan ditambah dengan dietil eter beberapa kali hingga dietil eter menjadi bening. Lalu, larutan ditambah

dengan asam asetat dan etil asetat (10mL/L) dan didiamkan selama 36 jam pada suhu ruang lalu diambil lapisan etil asetat, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh endapan, yang kemudian ditambah dengan 100 mL etanol. Hasil ini disebut sebagai ekstrak polifenol. Selanjutnya, ekstrak polifenol yang diperoleh dari *bees wax* yang diekstrak menggunakan pelarut heksana disebut sebagai (p1) dan yang diekstraksi dengan pelarut etil asetat disebut sebagai (p2).

Analisis Polifenol Total

20 µL ekstrak polifenol, 1,58 µL H₂O, dan 100 µL folin ciocalteu 10% dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Larutan tersebut didiamkan selama 8 menit. Kemudian ditambah 300 µL Na₂CO₃ 20% ke dalam setiap tabung kemudian dipanaskan pada 40°C selama 30 menit. Resapan larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada 765 nm [6].

Perlakuan pada Marmut

Sebanyak 75 ekor marmut jenis *anggora* dewasa yang didapat dari Kopeng diberi makan teratur berupa pelet selama 1 minggu, kemudian diukur kadar MDA awal. Marmut dibagi dalam 15 kelompok, setiap kelompok terdiri dari 5 ekor marmut dan diberi perlakuan sebagai berikut :

- Tiga kelompok diberi pestisida dengan kadar 300 mg/kg berat badan.
- Tiga kelompok diberi pestisida dengan kadar 300 mg/kg berat badan yang dicampur dengan ekstrak (p1) dengan konsentrasi 250 mg/kg berat badan.
- Tiga kelompok diberi pestisida dengan kadar 300 mg/kg berat badan yang dicampur dengan ekstrak (p1) dengan konsentrasi 500 mg/kg berat badan.
- Tiga kelompok diberi pestisida dengan kadar 300 mg/kg berat badan yang dicampur

dengan ekstrak (p2) dengan konsentrasi 250 mg/kg berat badan.

- Tiga kelompok diberi pestisida dengan kadar 300 mg/kg berat badan yang dicampur dengan ekstrak (p2) dengan konsentrasi 500 mg/kg berat badan.

Analisis Kandungan MDA pada Kencing Marmut

Kencing marmut ditimbang dalam kuvet kemudian ditambah dengan karbon aktif. Kemudian dipusingkan dengan sentrifuse selama 10 menit dengan kecepatan 800 rpm. 1 ml sampel + 1,5 ml asam asetat + 1,5 ml TBA 1% dalam 2% NaOH dimasukkan dalam tabung reaksi. Larutan dipanaskan pada suhu 100 °C selama 15 menit. Resapan larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada 560 nm. Kemudian dihitung kadar MDA tiap gram kencing marmut [7].

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemeriksaan Kadar Polifenol

Hasil pemeriksaan kadar polifenol dalam sarang lebah madu dengan menggunakan pelarut heksana dan etil asetat dapat dilihat pada Tabel 1. Ekstraksi menggunakan pelarut heksana menghasilkan kadar polifenol lebih kecil dibanding ekstraksi menggunakan etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa etil asetat lebih dapat mengikat polifenol dibanding heksana. Penggunaan kedua pelarut tersebut pada percobaan ini dikarenakan polifenol pada lebah madu diperoleh dari lilin lebah yang merupakan senyawa non polar sehingga untuk mendapatkan hasil yang maksimal digunakan pelarut yang bersifat non polar. Selain itu, heksana dan etil asetat dipilih karena tergolong dalam senyawa yang mudah menguap sehingga dimungkinkan kedua pelarut tersebut tidak lagi tertinggal dalam ekstrak polifenol. Kadar polifenol ekstrak lilin lebah

ini lebih kecil bila dibandingkan dengan kadar polifenol limbah teh, yaitu 2,73% [8].

Pemeriksaan Kadar MDA

Hasil pemeriksaan kadar MDA selama 7 hari pada kencing marmut yang diberi polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut heksana dapat dilihat pada Gambar 1. Kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi menggunakan pelarut heksana lebih rendah dibanding dengan kontrol dan mengalami kestabilan hingga hari ketiga kemudian naik hingga hari terakhir pengukuran, yaitu hari ketujuh. Hal ini menunjukkan bahwa polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut heksana hanya dapat menghambat kenaikan kadar MDA.

Hasil pemeriksaan kadar MDA selama 7 hari pada kencing marmut yang diberi polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut etil asetat dapat dilihat pada Gambar 2. Kadar MDA pada kencing marmut dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat lebih rendah dibanding dengan kontrol dan mengalami penurunan hingga hari keenam, kemudian pada kadar MDA mulai mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut etil asetat dapat memblokir (menghentikan) kenaikan kadar MDA selama beberapa saat.

Potensi Polifenol sebagai Bloking Pengaruh Pestisida

Kadar polifenol pada sarang lebah madu hasil ekstraksi menggunakan heksana dan etil asetat lebih kecil dibanding kadar polifenol pada limbah teh hijau. Akan tetapi kadar yang kecil pada sarang lebah membuktikan adanya kemampuan polifenol memblokir pestisida, oleh karena itu dapat didiuga bahwa limbah teh yang memiliki kandungan polifenol lebih tinggi dari sarang lebah memiliki potensi memblokir pestisida lebih baik.

Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut pada limbah teh hijau.

Pada Tabel 2 disajikan data penurunan kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi menggunakan pelarut heksana.

Pada Tabel 3 disajikan data penurunan kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat.

Pada manusia, stres oksidatif dapat menyebabkan berbagai macam penyakit, contohnya kanker. Tetapi spesies oksigen reaktif dapat bermanfaat oleh sistem kekebalan tubuh untuk menyerang dan membunuh patogen, MDA bereaksi dengan deoxyadenosine dan deoxyguanosine dalam DNA membentuk adduct DNA, terutama M₁G, yang mutagenik. Kelompok guanidin residu arginin mengembun dengan MDA untuk memberikan 2-aminopirimidin (Anonim³, 2009).

Akibat serangan radikal bebas maka akan terbentuk produk oksidatif yang sering digunakan sebagai marker untuk menilai stres oksidatif. Dengan penilaian yang akurat terhadap marker tersebut dapat diketahui kondisi patologis yang terjadi pada tubuh seseorang. Biomarker dapat ditemukan dalam darah, urin, dan cairan tubuh lainnya. Beberapa marker yang digunakan adalah MDA, 4-hidroksinenal akibat peroksidasi lipid, isoprostan akibat kerusakan asam arakidonat, 8-hidroksiguanin dan tiaminglikol akibat kerusakan DNA. Pada keadaan stres oksidatif yang tinggi, terjadi peningkatan kadar MDA serum secara signifikan. Bila keadaan stres oksidatif teratasi, kadar MDA kembali menurun (Anonim⁴, 2005).

Dari hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari polifenol yang dihasilkan dari ekstraksi sarang lebah madu signifikan, yaitu bisa mengais superoksida dan hidrosil radikal yang dihasilkan

oleh HCH (*hexachlorocyclohexane*) suatu komponen aktif dalam pestisida (Anilakumar, 2009).

Dengan demikian, polifenol memiliki potensi untuk melindungi hati dari stres oksidatif yang disebabkan oleh peningkatan MDA akibat pengaruh dari HCH (pestisida). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa polifenol hasil ekstraksi dengan pelarut etil asetat dengan kadar 500mg/kg berat badan menurut penelitian yang dilakukan merupakan polifenol yang paling efisien untuk memblokir MDA pada marmut. Jika ingin diterapkan pada manusia maka perlu dilakukan akumulasi kadar polifenol berdasarkan berat badan manusia.

KESIMPULAN

Kadar polifenol total pada lilin sarang lebah madu yang diekstraksi dengan pelarut heksana dan etil asetat berturut-turut adalah 0,68% dan 1,18%. Penurunan pengaruh pestisida ditinjau dari penurunan kadar MDA pada kencing marmut yang diberikan polifenol lilin lebah madu hasil ekstraksi dengan pelarut heksana paling efektif pada hari ketiga, yaitu sebesar 49,18% (250 mg/kg b.b) dan 55,02% (500 mg/kg b.b). Sedangkan dengan pelarut etil asetat paling efektif pada hari keenam, yaitu sebesar 90,28% (250 mg/kg b.b) dan 91,47 % (500 mg/kg b.b).

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Slamet Widodo, SP atas saran yang diberikan kepada penulis dalam melaksanakan penelitian ini. Terima kasih kepada Sunoto dan Aria Kencana A. yang telah membantu penulis dalam mengerjakan penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

[1] Jawi, I.M., Suprpta, D.N., dan Subawa, A.A.N., 2008. Ubi Jalar Ungu Menurunkan Kadar MDA dalam Darah dan Hati Mencit setelah Aktivitas Fisik Maksimal.

ejournal.unud.ac.id/abstrak/3.%20jawi%20et%20al.pdf, diakses 12/08/10

- [2] Sapto, Y., Wasito, Wuryastuti, H., 2002. Pengaruh Pemberian Vitamin E Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma Pada Tikus Yang Diberi Pakan Lemak Tinggi. <http://www.google.co.id/url?sa=t&source=http%3A%2F%2Filib.ugm.ac.id%2Fjurnal%2Fdownload.php=pengaruh%20malondialdehid%20bagi%20tubuh=rja>, (Diakses 02/08/10)
- [3] Anonim¹. 2010. Pestisida. <http://en.wikipedia.org/wiki/Pestisida>, (Diakses 02/08/10)
- [4] Anilakumar. 2009. Effect of Bees Wax Polifenol on Hexachlorocyclohexan Induced-oxidative Stress in Rat Liver.
- [5] Xia, J. and Allenbrand. 1998. *Dietary Supplementation of Grape Polyphenol and Chronic Ethanol Administration on LDL Oxidation and Platelet Function in Rats*. Life Sci, 63, 383-390.
- [6] Singleton, V.L. and Orthofer, R. 1999. *Analysis of Total Phenol and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin Ciocalteu Reagent*. Methods Enzymol, 299, 152-178.
- [7] Ichimoto, M., Noriko, I., Michiharu, S., Yoshiki, H., Shigeki, T., 1995. *Inhibition of glucose-induced insulin secreted by 4-hydroxynonenal and other lipid production product*. Faculty of Pharmacy, Meijo University Japan.
- [8] Frei, Balz dan Higdon, J.V., 2003. Antioxidant Activity of Tea Polyphenols In Vivo: Evidence from Animal Studies. Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in Tea Diet. *American Society for Nutritional Sciences: 3275S-3284S*

TANYA JAWAB

Nama Penanya : Haryoto

Nama Pemakalah : Silvie Andini

Pertanyaan :

1. Mengapa dipilih sarang lebah madu bukan sarang yang lain?

2. Bagaimana cara membuat ekstraksi dari sarang lebah madu?
3. Polifenil bersifat polar mengapa digunakan heksana untuk mendefeksi polifenol? Berikan alasannya!

Jawaban :

1. Untuk memanfaatkan "limbah" karena selama ini sarang lebah madu yang sudah dipanen dibuang begitu saja (belum dimanfaatkan). Didukung oleh hasil penelitian sebelumnya bahwa sarang lebah madu bekas

panen masih mengandung polifenol dan aktivitas antioksidan cukup tinggi.

2. Ada diprosedur percobaan.

Karena komponen utama sarang lebah madu adalah lipid dan menurut hasil penelitian lipid sarang lebah memiliki aktivitas antioksidan. Karena lipid bersifat non polar (heksana) dan etil metanoat (semi polar cenderung non polar)

LAMPIRAN

Tabel 1 Kadar polifenol (%) dalam ekstrak sarang lebah madu (*Trigona spp*) yang diperoleh dari ekstraksi dengan pelarut heksana (PH) dan etil asetat (PEA)

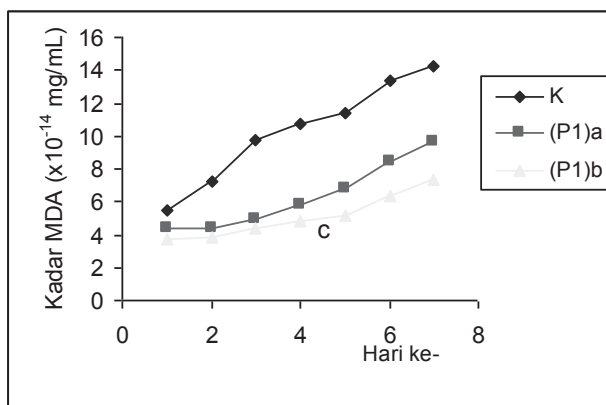
PH	PEA
0,68 %	1,18 %

Tabel 2 Persentase penurunan kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol ekstraksi menggunakan pelarut heksana

Hari	Polifenol 250 mg/kg b.b	Polifenol 500 mg/kg b.b
1	19,96	32,23
2	40,03	47,09
3	49,18	55,02
4	45,57	55,17
5	40,68	54,49
6	36,80	52,66
7	32,94	48,95

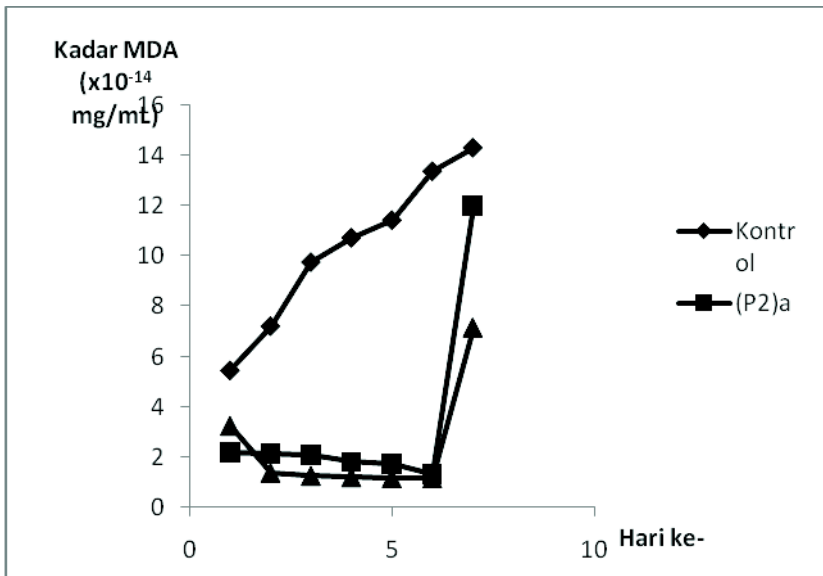
Tabel 3 Persentase penurunan kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat

Hari	Polifenol 250 mg/kg b.b	Polifenol 500 mg/kg b.b
1	59,89	40,66
2	70,64	81,02
3	78,59	87,30
4	83,32	89,00
5	84,95	89,94
6	90,28	91,47
7	16,01	49,93



Keterangan :
 K : kontrol
 (P1)a : perlakuan (p1) dengan kadar 250 mg/kg berat badan
 (P1)b : perlakuan (p1) dengan kadar 500 mg/ kg berat badan

Gambar 1 Grafik kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol hasil ekstraksi menggunakan pelarut heksana



Keterangan :
 K : kontrol
 (P2)a : perlakuan (P2) dengan kadar 250 mg/ kg berat badan
 (P2)b : perlakuan (P2) dengan kadar 500 mg/ kg berat badan

Gambar 2 Grafik kadar MDA pada marmut dengan pemberian polifenol ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat