

Penurunan Toksisitas Kadmium Dengan Kelator Alami Pegagan (*Centella Asiatica*) Ditinjau dari Kadar Malondialdehid (MDA) dan Superoksida Dismutase (SOD)

 Hernayanti¹, Sri Lestari²
^{1,2}Dosen Fakultas Biologi, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a heavy metal that is toxic to humans. Cadmium will bind to metalotionin in the liver to form Cd+MT bonds, which triggers the formation of free radicals and causes oxidative stress. Oxidative stress characterized by elevating of MDA and decreasing of antioxidant enzyme such as SOD. Gotu kola(Centella asiatica) contains active compounds medecassoside that can function to chelate Cd, decreasing MDA level caused by Cd-Mt bounded and generate SOD level. The aim of this study is to know the effect of Pegagan as natural chelator for Cd poisoning and as antioxidant. Twenty four rats were used in this research and divided into six groups with four replications. Group 1 (C1) as healthy. Group 2 (C2) was only given 14 mg/200 gBW of CdSO4 for 35 days. Group 3, 4, 5 and 6 were given CdSO4 14 mg / 200gBB and gotu kola extract dose of 20 mg/200gBB, 40 mg/200gBB, 60 mg/200gBB, 80 mg / 200gBB, for 21 days. The parameters studied were blood MDA and SOD level. Measuring parameters were done on the 36th day after administration of Centella extract. Data were analyzed by Anova and followed by Duncan test The results showed that Centella all doses can reduce MDA level and increase SOD level. A dose of 40mg / 200gBB Centella extract has been effective in reducing MDA level as well as increasing SOD level. It can be concluded that dose of 40mg/200gBB can use as a natural chelator of Cd and as antioxidant for Cd poisoning.

KEYWORDS

Cadmium, Metallothionein, Gotu Kola, MDA, SOD

PENDAHULUAN

Kadmium merupakan logam berat yang bersifat toksik bagi manusia. Keracunan yang disebabkan oleh kadmium dapat bersifat akut dan kronis. Absorpsi kadmium terutama melalui inhalasi. Kecepatan absorpsi diperkirakan sebesar 25–50% dalam bentuk partikel Cd oksida (CdO). Pada orang sehat, inhalasi partikel Cd selama 1 jam dapat menimbulkan gejala *metal fume fever* yang terjadi beberapa jam kemudian, dan diikuti perubahan tes fungsi paru. Dalam darah sekitar 90% kadmium terikat dengan sel darah merah (Caciari *et al.*, 2013). Kadmium sekitar 80-90% akan berikatan dengan metallothionein yaitu protein dengan berat molekul rendah yang disintesis di hati. Ikatan Cd dengan MT merupakan ikatan yang stabil sehingga memicu aktivasi radikal bebas *Reactive Oxygen spesies* (ROS) yang berlebihan dan menyebabkan reaksi berantai peroksidasi lipid yang merusak hati. Hasil akhir proses peroksidasi lipid adalah Malondialdehid (MDA) sehingga kadar MDA dapat dijadikan parameter banyaknya radikal

bebas dalam tubuh. Peningkatan kadar MDA plasma > 1 µmol/L merupakan indikasi adanya kerusakan hati (Bu *et al.*, 2011).

Peningkatan radikal bebas ROS juga menimbulkan stress oksidatif yang ditandai dengan penurunan aktivitas enzim antioksidan seperti Superoksida Dismutase (SOD). Fungsi SOD adalah mengubah Anion superoksida (O_2^-) menjadi H_2O_2 . Glutation juga dibutuhkan oleh enzim antioksidan Glutation peroksidase (GPx) yang berfungsi membantu aktivitas Super Oksida Dismutase (SOD) dalam menetralkan H_2O_2 menjadi $H_2O + O_2$ (Johnson *et al.*, 2012). Pencegahan keracunan Cd terhadap hati selama ini hanya menggunakan suplemen makanan seperti vitamin C, Vitamin E dan Selenium tetapi harganya mahal sehingga tidak dapat dijangkau oleh masyarakat berpenghasilan rendah seperti pekerja industri yang sehari-harinya kontak dengan Cd. Untuk mengatasi masalah keracunan Cd, perlu dicari alternatif dari bahan alami yang murah dan mudah didapat, serta tidak menimbulkan

kerusakan pada hati dan ginjal.

Salah satu bahan alami yang dapat dipilih adalah pegagan. Pegagan dalam percobaan invitro dapat mengkelat logam FeSO₄ dengan nilai IC 0.93 mg/L dan Pb asetat (Salim *et al.*, 2013). Kandungan senyawa aktif pegagan antara lain asiaticoside dari golongan triterpenoid dan madeccasoside dari golongan quersetin. Kedua senyawa ini potensial digunakan sebagai antioksidan, dan antihepatotoksin (Zheng and Qin, 2007., Chong and Aziz, 2013). Senyawa quersetin dan triterpenoid bekerja sama dengan mendonorkan H⁺ kepada radikal bebas sehingga menjadi netral. Aktivitas lainnya adalah mencegah pembentukan peroksidasi lipid dan menurunkan kadar MDA (Bu *et al.*, 2014., Yasurin *et al.*, 2016). Permasalahan yang timbul adalah masih jarang dilakukan penelitian untuk mendapatkan kelator alami dari tumbuhan untuk mengatasi keracunan Cd. Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui potensi pegagan sebagai penurun toksisitas kadmium atau sebagai penurun toksisitas Cd dan sebagai antioksidan untuk mengatasi stress oksidatif akibat paparan Cd.

METODE

a. Waktu dan Lokasi Penelitian

Pegagan diambil dari desa Pamijen kecamatan Baturaden. Pembuatan ekstrak pegagan di laboratorium Ekotoksikologi Fakultas Biologi, tikus dipelihara di Animal House di FIKES jurusan Farmasi. Pemeriksaan kadar MDA dan SOD di Laboratorium Utama Medico Labora Purwokerto.

b. Bahan dan Alat yang digunakan

Bahan yang digunakan berupa sampel darah tikus, kit komersial MDA dan SOD Randox. Alat yang digunakan Spektrofotometer merk Riele.

c. Metode

Penelitian akan dilakukan secara eksperimental dengan metode RAL yang terdiri dari 6 perlakuan dan 4 kali ulangan sebagai berikut:

K1: kontrol negatif: tidak diberi paparan Cd maupun ekstrak pegagan, K2: Kontrol positif: dipapar Cd dosis 25% dari LD₅₀ (14mg/gBB) tanpa ekstrak pegagan selama 35 hari. K3 dipapar Cd 14 hari dan diberi ekstrak pegagan dengan

dosis 20 mg/g BB selama 21 hari. K4: dipapar Cd dengan dosis 25% dari LD₅₀ selama 14 hari dan diberi ekstrak pegagan dosis 40 mg/g BB selama 21 hari. K5: Perlakuan 5, dipapar Cd dengan dosis 25% dari LD₅₀ selama 14 hari dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 60 mg/g BB selama 21 hari. K6: dipapar Cd dengan dosis 25% dari LD₅₀ selama 14 hari dan diberi ekstrak pegagan dengan dosis 80 mg/kg BB selama 21 hari. Variabel bebas berupa dosis ekstrak pegagan dan variable tergantung berupa perubahan kadar MDA dan SOD. Parameter yang diamati adalah kadar MDA dan SOD.

d. Pembuatan ekstrak pegagan

Pembuatan ekstrak pegagan dengan metode Maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dilakukan 3x24 jam. Maserat dimasukkan ke dalam *Vacum Rotary Evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental dari simplisia pegagan. Dosis ekstrak pegagan yang digunakan adalah 100 mg/kg BB, 200 mg/kg BB, 300 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB. Dosis tersebut kemudian dikonversi menjadi 20, 40, 60, 80 mg/g BB tikus. Kemudian ekstrak kental diambil sesuai volume dosis yang ditentukan dan dilarutkan dalam 10 mL aquades. Pemberian perlakuan ekstrak pegagan dilakukan selama 21 hari. sesuai dengan dosis perlakuan masing-masing sebanyak 2mL dengan cara disonde (Yasurin *et al.*, 2012).

e. Teknik Pengumpulan Data

Sebelum dilakukan penelitian peneliti mengajukan Etichal Clearance ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Unsoed.

1) Preparasi sampel

Setelah tikus putih diaklimasi selama 7 hari dan diberi perlakuan CdSO₄ dan ekstrak pegagan, darah tikus putih (*R.norvegicus*) diambil menggunakan pipet kapiler hematokrit dari vena pleksus orbitalis. Darah dimasukan ke dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit sehingga didapatkan serum darah tikus. Pengambilan darah pada hari ke-0 dan ke 36.

2) Pengukuran parameter

Kadar MDA diperiksa dengan Metode TBARS menggunakan larutan standar 1.1.3.3

tetraethoxypropane (Wuryastuti, 2000). Kadar SOD diperiksa dengan menggunakan metode SOD Randox (Randox Laboratories, 2009).

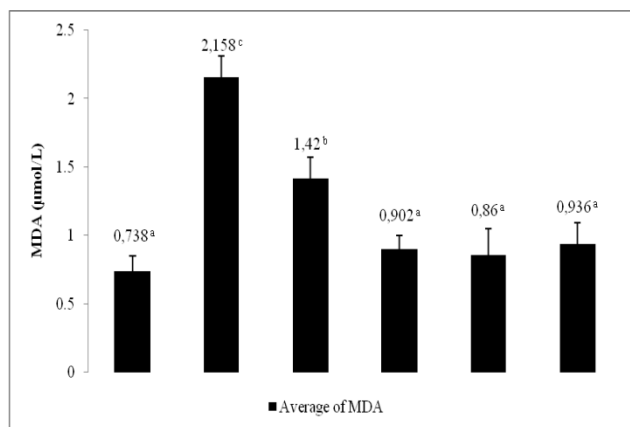
f. Analisis Data

Data hasil penelitian seluruh parameter dianalisis menggunakan uji Anova dan dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui letak perbedaan masing-masing perlakuan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kadar Malondialdehid (MDA)

Kadar MDA pada tikus kontrol dan perlakuan pada hari ke 36 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Rerata kadar MDA tikus kontrol dan perlakuan

Keterangan: Kolom yang ditandai dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf $P < 0,05$. K1: Kontrol Sehat; K2: Kontrol Sakit; K3: Pemberian Ekstrak Pegagan 20 mg; K4: Pemberian Ekstrak Pegagan 40 mg; K5: Pemberian Ekstrak Pegagan 60 mg; K6: Pemberian Ekstrak Pegagan 80 mg/Kg

Gambar 1 menunjukkan Kadar MDA pada K2 yaitu kelompok kontrol sakit yang hanya diberi CdSO₄ dengan dosis 14 mg/g BB selama 35 hari, memiliki kadar MDA tertinggi dibanding kelompok kontrol sehat dan kelompok perlakuan. Peningkatan kadar MDA disebabkan karena Cd yang masuk tubuh akan berikatan dengan metalotionin. Ikatan Cd-Mt merupakan ikatan yang stabil sehingga tidak mudah dilepaskan sebagai akibatnya akan memicu pembentukan radikal bebas yang berlebihan seperti anion superoksida (O₂⁻), radikal hidroksil (OH⁻) dan hidrogen peroksida (H₂O₂). (Bernhof, 2013.,

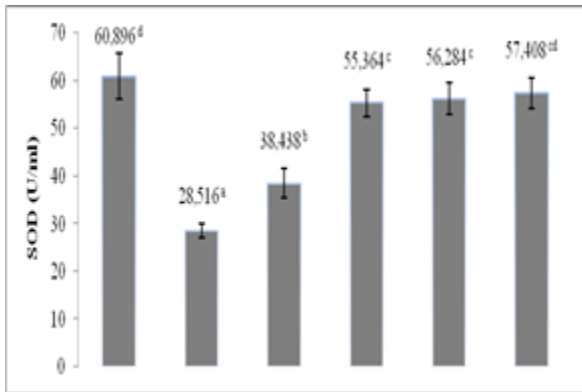
Akesson *et al.*, 2014). Peristiwa ini diikuti dengan terjadinya reaksi berantai peroksidasi lipid yang dapat merusak protein membran sel hati dan ginjal. Hasil akhir proses peroksidasi lipid adalah MDA sehingga kadar MDA yang diukur tinggi. Semakin banyak radikal bebas yang masuk tubuh maka kadar MDA juga semakin meningkat (Camila *et al.*, 2014., Bashir *et al.*, 2014).

Setelah tikus diberi ekstrak pegagan maka terjadi penurunan kadar MDA. Perlakuan semua dosis ekstrak 20 mg/gBB, 40 mg/gBB, 60 mg/gBB dan 80 mg/gBB dapat menurunkan kadar MDA berturut-turut sebesar 34,20% ; 58,20% ; 60,15%; 56,63%. Hal ini disebabkan karena pegagan mengandung senyawa aktif flavonoid berupa madekakosida yang termasuk golongan quersetin. Quersetin akan mendonorkan H⁺ kepada radikal bebas yang masuk tubuh sehingga menjadi netral. Pegagan juga mengandung asiakotida yang merupakan triterpenoid. Senyawa triterpenoid juga mendonorkan H⁺ kepada radikal bebas bekerja sama dengan quersetin, sehingga dapat meredam atau menangkap radikal bebas (Singh *et al.*, 2012; Kumar, 2014).

Hasil analisis statistik juga menunjukkan perbedaan yang sangat nyata antara kontrol sakit dengan kontrol sehat dan perlakuan dengan ekstrak pegagan. Hasil uji Duncan menunjukkan tidak ada perbedaan yang nyata antara kadar MDA kelompok kontrol sehat dengan perlakuan ekstrak pegagan dosis 40 mg/gBB, 60 mg/gBB dan 80 mg/gBB. Dosis ekstrak pegagan 40 mg/gBB merupakan dosis yang sudah cukup efektif untuk menurunkan kadar MDA tikus putih.

2. Kadar Super Oksida Dismutase (SOD)

Kadar SOD pada tikus kontrol dan perlakuan pada hari ke 36 dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Kadar SOD rerata pada kelompok kontrol dan perlakuan

Keterangan: Kolom yang ditandai dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf $P < 0,05$. K1: Kontrol Sehat; K2: Kontrol Sakit; K3: Pemberian Ekstrak Pegagan 20 mg; K4: Pemberian Ekstrak Pegagan 40 mg; K5: Pemberian Ekstrak Pegagan 60 mg; K6: Pemberian Ekstrak Pegagan 80 mg/Kg BB.

Rerata kadar SOD terendah terdapat pada K2 yaitu kelompok yang hanya diinduksi $CdSO_4$. Hal ini menunjukkan bahwa akibat paparan Cd , tikus mengalami stress oksidatif yaitu ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen. Enzim SOD merupakan lini pertahanan pertama terhadap radikal bebas terutama terhadap anion superoksida (O_2^-). Fungsi SOD adalah untuk mengubah O_2^- menjadi H_2O_2 . Selanjutnya oleh enzim katalase atau oleh Glutation peroksidase H_2O_2 akan dinetralkan menjadi H_2O dan O_2 . Reaksi antara Cd dengan Mt memicu pembentukan O_2^- yang berlebihan sehingga kadar SOD menurun. (Hijova *et al.*, Johri *et al.*).

Setelah tikus diberi ekstrak pegagan selama 21 hari, maka terjadi peningkatan kadar SOD. Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kontrol sakit dengan kelompok tikus yang diberi ekstrak pegagan semua dosis. 20 mg/gBB, 40 mg/gBB, 60 mg/gBB dan 80 mg/gBB dapat meningkatkan kadar SOD. Peningkatan kadar SOD dosis berturut-turut sebesar 34,8%, 94,15%, 97,37% dan 101,3%. Peningkatan kadar SOD disebabkan karena pegagan mengandung senyawa aktif asiaticosida yaitu derivat flavonoid berupa quersetin dan medekakosida derivate triterpenoid. Aktivitas biologis asiaticosida dan

madeccasoside dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif akibat serangan radikal bebas adalah bekerja sama dengan mendonorkan H^+ kepada radikal bebas sehingga menjadi netral. Hal ini akan menstimulasi kerja antioksidan enzimatis SOD, Glutation Peroksidase (GPx) dan Katalase yang kadarnya menurun akibat paparan Cd . (Bu *et al.*, 2011., Yasurin *et al.*, 2016). Lin *et al.*, 2013 dan BP POM RI, 2010 juga melaporkan bahwa pegagan juga mengandung vitamin C yang dapat berfungsi untuk membantu SOD menetralkan radikal bebas dengan memutus rantai peroksidasi lipid.

Hasil analisis statistik menunjukkan terdapat perbedaan yang sangat nyata antara kelompok kontrol sakit dengan kontrol sehat dan semua dosis pegagan yang dicobakan. Kelompok K4 dan K5 yaitu dosis pegagan 40 mg/gBB dan 60 mg/gBB menunjukkan perbedaan yang tidak nyata, artinya memiliki efek yang sama dalam meningkatkan kadar SOD. Kelompok K6 dosis pegagan 80 mg/gBB memiliki efek yang sama dengan K4 dan K5 tetapi kadar SOD pada K6 tidak berbeda nyata dengan kontrol sehat atau memiliki kadar SOD mendekati kontrol sehat. Tetapi dari segi efektivitas dosis pegagan 40 mg/gBB sudah efektif dalam meningkatkan SOD dan kadar SOD sudah mendekati kadar SOD pada kontrol sehat.

KESIMPULAN

Pegagan dapat berfungsi untuk menurunkan toksisitas kadmium dan sebagai antioksidan untuk menangani stress oksidatif. Dosis ekstrak pegagan 40 mg/gBB sudah cukup efektif untuk menetralkan keracunan kadmium pada tikus putih yang terpapar kadmium

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih atas dana BLU Skema Riset Terapan Unggulan Institusi Tahun Anggaran 2019 yang diberikan lewat LPPM Unsoed dengan Nomor kontrak P/310/UN23/14/PN/2019, sehingga penelitian

ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Åkesson, A., Barregard, L., Bergdahl, I.A., Nordberg, G.F., Nordberg, M. and Skerfving, S. (2014). Non-renal effects and the risk assessment of environmental cadmium exposure. *Environ. Health Perspect.*, 122 : 431-438.
- Badan POM RI. (2010). Serial Data Terkini Tumbuhan Obat. Pegagan (*Centella asiatica* L). Direktorat Obat Asli Indonesia. BPOM. Jakarta.
- Bashir, N., Manoharan, V. & Prabu, S., (2014). Cadmium Toxicity: Oxidative Stress and Organ Dysfunction. *STM Journals*, 4(2), pp. 1-19.
- Bernhoft, R.A, (2013). Cadmium toxicity and treatment. *The Scientific World Journal* 13: 1-7.
- Bu, T., Yuling, M., Weidong, Z. & Caiqiao, Z., (2011). Protective Effect of Quercetin on Cadmium-Induced Oxidative Toxicity on Germ Cells in Male Mice. *The Anatomical Record*, 294(3) : 520-526.
- Caciari, T., A. Sancini., M. Fioravanti., A. Cappozella., T. Casale *et al*, (2013). Cadmium and hypertension in exposed workers : A Meta-analysis. *Int J Occup Med Environ Health* 26 (3) : 440-456.
- Camila, C. Almenara. Gilson, B. Broseghini, F. Marcus, V. Vescovi *et al*. (2013). Chronic Cadmium Treatment Promotes Oxidative Stress and Endothelial Damage in Isolated Rat Aorta. *Plos one*. 8:1.
- Chong, N.J., Z. Aziz, V. Jhala, and V. S. Thaker, (2014). "A systematic review on the chemical constituents of *Centella asiatica*," *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4 :43-47.
- Hijova, E., F. Nistiar and M. Kuchta, (2004). Influence of acute cadmium exposure on plasma antioxidant parameters in rats. *Bulletin of the Veterinary Research Institute Pulawy*. 48 (2) : 155-157.
- Johnson, D. W., R.D.J Graham., H.M Timothy., J.L. Marie., P.D. Matthew and P.D. Matthew (2012). Chronic kidney disease and automatic reporting of estimated glomerular filtration rate : new developments and revised recommendations. *Medical Journal of Australia* : 197(4) : 1-5.
- Johri, N., J. Gregory and U. Robert. (2010). Heavy metal poisoning the effects of cadmium on the kidney. *Biometals* : 23 : 783-792.
- Kumar, V, (2014). "Effect of *Centella asiatica* against anti tuberculosis drugs-induced hepatotoxicity: Involvement of mitochondria and oxidative stress", 3(5) : 310-311.
- Lin, K.H., Y.Y. Yang., C.M. Yang., M.Y. Huang., H.F. Lo ., K.C. Liu., H.S. Lin and P.Y. Chao, (2013). Antioxidant activity of herbaceous plant extracts protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human lymphocytes. . *BMC Research Notes* 2013,6:490.
- Randox Laboratories, (2009). Manual procedure RanSOD. Randox Laboratories Ltd. Crumlin, Co Antrim, United Kingdom.
- Salim, R.J.M., M.I. Adenan., A. Amid., M.H. Jauri and A.S. Sued, (2013). Statistical Analysis of Metal Chelating Activity of *Centella asiatica* and *Erythroxylum cuneatum* Using Response Surface Methodology. Hindawi Publishing Corporation. *Biotechnology Research International* pp:1-5.
- Singh, J., Singh, P., Gupta, A., Solanki, S., Sharma, E., & Nema, R. (2012). Qualitative Estimation of the Presence of Bioactive Compound in *Centella Asiatica*: An Important Medicinal Plant. *International Journal of Life Science and Medical Science*. 2(1): 5-7
- Wuryastuti, H. (2000). The influence of dietary proteins and fats on plasma lipid in Spague-Dawley rats. *Indo Food and Nut Progress* : 7(2): 38.
- Yasurin, P., M. Sriariyatun, T. Phusantisampan,

- (2016). The bioavailability activity of *Centella asiatica*. *KMUTB. J. Appl. Sci. Technol* 9(1): 1-9.
- Xu, M.F., Y.Y.Xiong., Y.K Liu., J.J. Qian., L. Zhu and J. Gao. (2012). Asiatic acid, a pentacyclic triterpene in *Centella asiatica*, attenuates glutamate-induced cognitive deficits in mice and apoptosis in SH-SY5Y cells. *Acta Pharmacologica Sinica*(2012) 33: 578–587.
- Zheng, C and L. Qin, (2007). “Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities,” *Journal of Chinese Integrative Medicine* 5: 348-351.