

Identifikasi dan Uji In Silico Potensi Anti Inflamasi Dan Antioksidan Senyawa Polifenol Ekstrak Metanol Biji *Tamarindus indica*

Identification and In Silico Analysis of Anti Inflammation and Anti Oxidant Potentials of Polyphenol Compounds in Methanol Extract of Tamarindus indica Seeds

Muhammad Ihwan Narwanto¹, Masruroh Rahayu², Setyawati Soeharto³, Nurdiana³, Moch. Aris Widodo³

¹Program Doktor Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,
Laboratorium Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Jember

²Departemen Neurologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

³Departemen Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

e-mail korespondensi: muhammadnarwanto@unej.ac.id

Abstrak

Ketersediaan biji *Tamarindus indica* di Indonesia cukup banyak dan melimpah, tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal khususnya dalam bidang kesehatan. Biji *Tamarindus indica* memiliki kandungan senyawa polifenol cukup tinggi. Belum ada penelitian yang didukung data in silico tentang senyawa polifenol dalam ekstrak biji *Tamarindus indica*. Senyawa polifenol dapat dimanfaatkan sebagai bahan neuroprotektif. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengukur kadar senyawa polifenol dalam ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* dan mengetahui potensi anti inflamasi dan antioksidan masing-masing senyawa polifenol secara in silico. Ekstraksi biji *Tamarindus indica* dengan metode maserasi dan pelarut metanol. Identifikasi dan pengukuran kadar senyawa polifenol menggunakan HPLC-MS, analisis in silico menggunakan tool Pymol dan Pyrx. Didapatkan residu ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* sebanyak 12 %w/v. Analisis HPLC-MS menyebutkan kadar procyanidin B2, myricetin dan caffeic acid secara berurutan adalah 38.850 mg/kg, 5.845 mg/kg dan 260 mg/kg. Secara in silico potensi anti inflamasi tertinggi dimiliki oleh myricetin kemudian caffeic acid dan terendah procyanidin B2, sedangkan potensi antioksidan tertinggi dimiliki myricetin kemudian procyanidin B2 dan terendah pada caffeic acid. Sangat dimungkinkan ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* dimanfaatkan untuk pencegahan penyakit neurodegeneratif karena pathogenesis penyakitnya melibatkan proses inflamasi dan stres oksidatif.

Kata kunci : *Tamarindus indica*, myricetin, procyanidin B2, caffeic acid, anti infamasi, antioksidan

Abstract

Indonesia has abundant stock of Tamarindus indica seeds, but it is not yet utilized maximally, especially in medical field. Tamarindus indica seeds have high content of polyphenols compound. No reseacrh is supported by in silico data on polyphenol compound in Tamarindus indica seeds extract. Polyphenols compound can be utilized as a neuroprotective agent. This research aims to measure polyphenols concentration in methanol Tamarindus indica seeds extract and determine the anti inflammation and antioxidant potential of each polyphenol compound in methanol Tamarindus indica seeds extract by in silico method. The extraction of Tamarindus seeds used maceration method and methanol as solvent. Identification and measurement of polyphenols compound applied HLPC-MS. PyMol and Pyrx tools were used for in silico analysis. Extract recidu was obtained from methanol Tamarindus indica seeds as much as 12%w/v. HPLC-MS anaysis mentioned that levels of procyanidin B2, myricentin and caffeic acid were respectively 38.850 mg/kg, 5.845 mg/kg and 260 mg/kg. The highest anti inflammatory potential was owned by myricentin than caffeic acid, while the lowest potential in procyanidin B2. Furthermore, the highest antioxidant potential was sequentially in myricentin, procyanidin B2 and caffeic acid. It is very possible to utilize methanol Tamarindus indica seeds extract for preventing neurodegenerative diseases since its pathogenesis involves inflammatory and stress oxidative process.

Keywords: *Tamarindus indica*, myricetin, procyanidin B2, caffeic acid, anti inflammatory, antioxidant

Pendahuluan

Pada pengobatan tradisional, bagian tanaman *Tamarindus indica* antara lain daun, bunga, buah, kulit dan akar telah banyak digunakan sebagai terapi pada berbagai penyakit diantaranya peradangan, tumor, gigitan ular, penyembuhan luka, fraktur dan demam (Kuru 2014; Meher *et al.*, 2014). *Tamarindus indica* merupakan tanaman endemis di daerah tropis (El-Siddig *et al.*, 2006). Ketersediaan biji *Tamarindus indica* di Indonesia cukup banyak dan melimpah, tetapi belum dimanfaatkan secara maksimal khususnya dalam bidang kesehatan (Balittri, 2017).

Penelitian Chunglok *et al.*, 2014, menunjukkan bahwa biji *Tamarindus indica* memiliki kandungan senyawa polifenol lebih tinggi dibanding biji tanaman lainnya. Penelitian Razali *et al.*, 2015, menyebutkan kandungan senyawa polifenol dalam ekstrak biji *Tamarindus indica* antara lain procyanidin B2, caffeic acid dan myricetin. Kandungan bahan aktif senyawa polifenol pada tanaman diyakini dapat memberikan manfaat neuroprotektif, diantaranya melalui efek anti inflamasi dan antioksidan (Rossi *et al.* 2008, Spencer 2009). Inflamasi dan stres oksidatif terlibat penting dalam pathogenesis penyakit neurodegeneratif antara lain parkinson, alzheimer dan hutington disease (Amor *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017).

Belum ada penelitian identifikasi senyawa polifenol dalam ekstrak biji *Tamarindus indica* yang didukung data *in silico* tentang potensi anti inflamasi dan antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengukur kadar senyawa polifenol dalam ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* dan mengetahui potensi anti inflamasi dan antioksidan masing-masing senyawa polifenol secara *in silico*.

Metode Penelitian

Biji *Tamarindus indica*

Biji *Tamarindus indica* didapatkan langsung dari pohon di wilayah Jember pada periode Juni 2017. Identifikasi spesies dilakukan di LIPI UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi dengan no identifikasi 0876/IPH.06/HM/VII/2017.

Bahan kimia. Standar procyanidin B2 dan caffeic acid (ChemFaces PRC), myricetin (Sigma USA). Mobile fase acetic acid 2%, double distilat water dan acetonitril.

Persiapan sampel. Biji dipisahkan dari daging buah, selanjutnya dicuci dengan aquades. Pengeringan pada suhu ruang selama 7 hari, kemudian dilakukan penggilingan.

Pembuatan ekstrak. Serbuk biji *Tamarindus indica* (100gr) dilarutkan dalam methanol (500ml) selama 72 jam pada suhu kamar. Setelah itu disaring dan larutan dievaporasi dengan water bath untuk mendapatkan residu ekstrak. Simpan pada suhu -200C (Bandawane *et al.*, 2013).

Analisis HPLC-MS. Alat HPLC-MS (shimadzu LC-MS 2020) dengan colom SunFire C18 (5µm, 4.6x150mm) diatur sesuai dengan keadaan yang diinginkan (proses pemisahan 13 menit, kecepatan alir 1 ml/menit), kemudian sampel ditempatkan pada auto sample SIL 20AC (Shimadzu). Mobile fase, larutan A acetic acid 2% dalam air double distilat, larutan B acetonitril dengan gradien 5% hingga 100% dalam 10 menit, kemudian dipertahankan 100% selama 3 menit sampai dengan selesai. Setelah proses pemisahan selesai akan dihasilkan grafik yang menunjukkan senyawa-senyawa yang mengalami pemisahan sesuai dengan waktu retensinya dan berat molekul, bandingkan hasil dengan standar.

Analisis *insilico*. Analisis aktifitas biologi berdasarkan nilai Probability activity (Pa) dengan rentang nilai 0 sampai dengan 1. Menggunakan tool : PyMol dan PyRx.

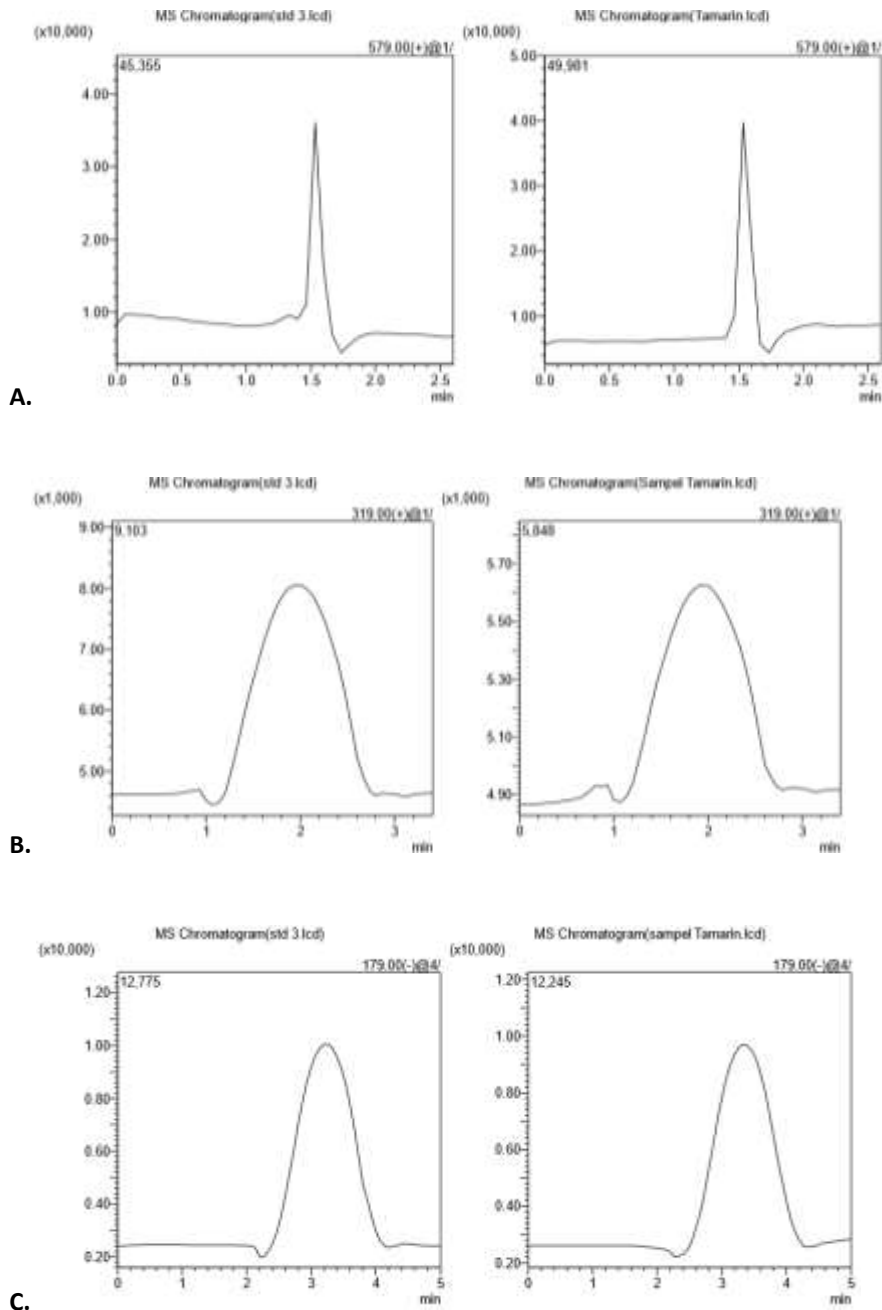
Hasil Penelitian

Ekstraksi

Didapatkan residu ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* sebanyak 12 %w/v.

HPLC-MS

Hasil analisis HPLC-MS kadar procyanidin B2, myricetin dan caffeic acid secara berurutan adalah 38.850 mg/kg (3,89%), 5.845 (0,58%) mg/kg dan 260 mg/kg (0,03%). Gambar kurva kadar masing-masing senyawa dapat dilihat pada Gambar 1.



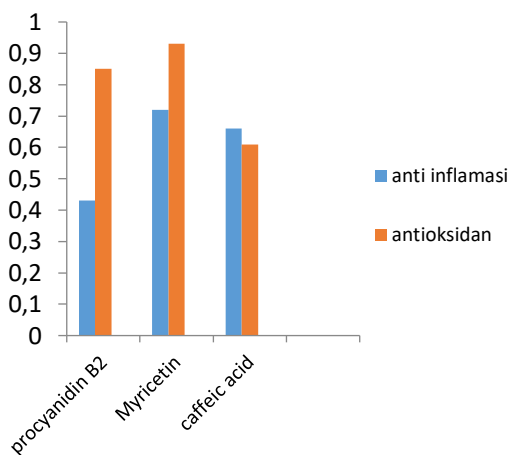
Gambar 1. Chromatogram standar dan sampel ekstrak biji *Tamarindus indica*.

- A. Chromatogram standar procyanidin B2 dan sampel.
- B. Chromatogram standar myricetin dan sampel.
- C. Chromatogram standar caffeic acid dan sampel.

In silico

Hasil uji in silico potensi anti inflamasi dan antioksidan dari ketiga senyawa procyanidin B2, myricetin dan caffeic acid dapat dilihat pada gambar

2. Potensi antioksidan tertinggi dimiliki oleh myricetin kemudian procyanidin B2 dan terendah dimiliki caffeic acid. Potensi anti inflamasi tertinggi pada myricetin kemudian caffeic acid dan terendah dimiliki procyanidin B2.



Gambar 2. Potensi anti inflamasi dan antioksidan senyawa polifenol dalam ekstrak biji *Tamarindus indica*.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan analisis dengan HPLC-MS kadar senyawa dalam ekstrak metanol biji *Tamarindus indica* yaitu procyanidin B2 paling banyak (kadar procyanidin B2 cukup besar hampir mencapai 4 %) dibandingkan myricetin dan terkecil adalah caffeic acid. Hal ini berbeda dengan penelitian Razali, *et al.*, 2015, dengan lama perendaman selama 24 jam dan menggunakan UHPLC menghasilkan senyawa terbesar adalah procyanidin B2 sebesar (0,06%) kemudian caffeic acid dan myricetin paling kecil diantara ketiganya. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan asal daerah sampel dan lama waktu perendaman biji *Tamarindus indica*. Waktu ekstraksi yang lebih lama akan menghasilkan residu ekstrak yang lebih banyak dan potensi aktifitas biologi yang lebih tinggi (Baldosano *et al.*, 2015; Sulaiman *et al.*, 2017).

Berdasarkan nilai probability activity uji in silico, jika nilai $P_a > 0,7$ maka perkiraan secara laboratorium akan sesuai dengan uji komputasi. Hal tersebut menunjukkan myricetin memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidan tertinggi dibanding ketiga senyawa lainnya, procyanidin B2 cukup tinggi pada potensi antioksidannya tetapi rendah pada potensi anti inflamasi, sedangkan caffeic acid memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidan yang sebanding tetapi dengan nilai $P_a < 0,7$. Hasil komputasi tersebut sejalan dengan beberapa hasil penelitian yang ada. Penelitian Zhao *et al.*, 2013 menunjukkan adanya potensi anti inflamasi dan antioksidan dari senyawa myricetin ditandai dengan adanya penurunan MDA, penurunan IL1 β dan IL6

pada tikus model kolitis ulceratif. Potensi anti inflamasi dan antioksidan dimiliki oleh procyanidin B2, ditunjukkan adanya penurunan kadar IL6 dan PGE2 pada kultur dipapar LPS. Peningkatan enzim prooksidan dan penurunan MDA pada hepar tikus dipapar CCl4 (Martinez *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). Caffeic acid memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidan ditunjukkan adanya penurunan malondialdehide (MDA) dan nitric oxide (NO) pada jaringan otak tikus (Kim *et al.*, 2015). Penurunan IL1 β dan TNF α pada tikus model DM (Chao *et al.*, 2009) Pathogenesis penyakit neurodegeneratif terjadi karena adanya inflamasi dan stres oksidatif (Rasool *et al.*, 2014). Sehingga bahan yang memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidatif sangat bermanfaat sebagai neuroprotektif, untuk pencegahan penyakit neurodegeneratif (Fratiglioni & Qiu 2009, Singh 2015). Sehingga sangat dimungkinkan pemanfaatan ekstrak biji *Tamarindus indica* sebagai sumber pencegahan untuk penyakit neurodegeneratif antara lain alzheimer dan parkinson. Dapat disimpulkan, terdapat senyawa procyanidin B2, myricetin dan caffeic acid dalam ekstrak metanol biji *Tamarindus indica*, dan ketiganya memiliki potensi anti inflamasi dan antioksidan yang bersifat neuroprotektif.

Daftar Pustaka

- Amor, S., *et al.* (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases—an update. *Immunology* 142(2): 151-166.
- Baldosano, H. Y., *et al.* (2015). Effect of particle size, solvent and extraction time on tannin extract from *Spondias purpurea* bark through soxhlet extraction. *Proceedings of the DLSU Research Congress*.
- Balittri., (2017). Retrieved from http://balittri.litbang.pertanian.go.id/index.php?option=com_content&task=view&id=75&Itemid=1&lang=ba
- Bandawane, D., *et al.* (2013). Evaluation Of Anti-Inflammatory And Analgesic Activity Of Tamarind (*Tamarindus indica* L.) Seeds. *Int J Pharm Pharm Sci*, 5, 623-629.
- Chao, P., *et al.* (2009). Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutrition & metabolism*, 6(1), 1.
- Chunglok, W., *et al.* (2014). Antioxidant and Antiproliferative Activities of Non-Edible Parts

- of Selected Tropical Fruits. *Sains Malaysiana*, 43(5), 689-696.
- El-Siddig, K. (2006). Tamarind: *Tamarindus indica* L (Vol. 1): Crops for the Future.
- Fratiglioni, L. and C. Qiu (2009). Prevention of common neurodegenerative disorders in the elderly. *Experimental gerontology* 44(1): 46-50.
- Kim, J. H., *et al.* (2015). Protective role of caffeic acid in an A β 25-35-induced Alzheimer's disease model. *Nutrition research and practice*, 9(5), 480-488.
- Kuru, P. (2014). *Tamarindus indica* and its health related effects. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(9), 676-681.
- Liu, Z., *et al.* (2017). Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2017.
- Martinez-Micaelo, N., *et al.* (2012). Omega-3 docosahexaenoic acid and procyanidins inhibit cyclo-oxygenase activity and attenuate NF- κ B activation through a p105/p50 regulatory mechanism in macrophage inflammation. *Biochemical Journal*, 441(2), 653-663.
- Meher, B., *et al.* (2014). A review on: Phytochemistry, pharmacology and traditional uses of *Tamarindus indica* L. *World J Pharm Pharmaceut Sci*, 3, 229-240.
- Rasool, M., *et al.* (2014). Recent Updates in the Treatment of Neurodegenerative Disorders Using Natural Compounds. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*,
- Razali, N., *et al.* (2015). Polyphenols from the extract and fraction of *T. indica* seeds protected HepG2 cells against oxidative stress. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 1.
- Rossi, L., *et al.* (2008). Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochemical research*, 33(12), 2390-2400.
- Singh, S. (2015). Antioxidants as a preventive therapeutic option for age related neurodegenerative diseases. *Therapeutic Targets for Neurological Diseases* 2.
- Spencer, J. P. (2009). Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes & nutrition*, 4(4), 243-250.
- Sulaiman, I. S. C., *et al.* (2017). Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chemistry Central Journal* 11(1): 54.
- Yang, B.-Y., *et al.* (2015). Protective effect of procyanidin B2 against CCl₄-induced acute liver injury in mice. *Molecules*, 20(7), 12250-12265.
- Zhao, J., *et al.* (2013). Protective effect of myricetin in dextran sulphate sodium-induced murine ulcerative colitis. *Molecular medicine reports*, 7(2), 565-570.