

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK BEKATUL PADI AWET DAN FRAKSINYA SECARA *IN VITRO*

[*In Vitro* Antioxidant Activity of Stabilized Rice Bran and Its Fraction]

Evy Damayanthi ¹⁾, Deddy Muchtadi ²⁾, Fransiska Rungkat Zakaria ²⁾,
Hidayat Syarief ¹⁾, C. Hanny Wijaya ²⁾, dan Djoko Said Damardjati ³⁾

¹⁾ Staf Pengajar Departemen Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga-FAPERTA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor

²⁾ Staf Pengajar Departemen Teknologi Pangan dan Gizi- FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

³⁾ Ahli Peneliti Utama Bidang Pangan pada Badan Litbang Pertanian, Jakarta

Diterima 28 Agustus 2003 / Disetujui 15 April 2004

ABSTRACT

Some researches indicated that oryzanol had antioxidant activity, however, the information about the oryzanol role in prevention of low density lipoprotein (LDL) and human lymphocyte from oxidation under oxidative stress was still limited. The objective of this study was to investigate the antioxidant activity of oryzanol at concentrations based on rice bran beverage model in preventing LDL and lymphocyte from oxidation.

Human plasma were supplemented with the samples of : rice bran oil (RBO), unsaponifiable matter and oryzanol IR-64, oryzanol IR-64 3x and oryzanol standard at the concentrations of 308.3, 22.2, 5.2, 10.4 and 10.4 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Afterward, the human LDL were collected by ultracentrifuge and diluted until a concentration of 200 $\mu\text{g protein/ml}$ was reached. Human LDL isolates were then oxidized with CuSO_4 5 μM for measuring antioxidant activity of the samples.

The length of incubation, H_2O_2 concentration, period of sample supplemented into human lymphocyte culture were determined before the antioxidant activity of RBO and its fraction in lymphocyte was measured. The samples used in the lymphocyte were RBO IR-64, unsaponifiable matter IR-64, and oryzanol standard at the concentrations of 133.2 - 2,132.0 $\mu\text{g/ml}$, 9.6 - 153.6 $\mu\text{g/ml}$, and 2.4 - 37.7 $\mu\text{g/ml}$, consecutively.

The result showed that malonaldehyde concentration in human LDL decreased significantly ($\alpha= 0.05$), 15 - 41% and 39 - 56 % compared to the control. The absorbance of living lymphocyte cell in culture was not influenced by the type and concentration of RBO and its fraction. The addition of hydrogen peroxide (H_2O_2) 3 mM into culture significantly lowered the absorbance as compared to culture without H_2O_2 .

Key words : Oryzanol, oxidative stress, LDL-oxidized, lymphocyte and antioxidant activity

PENDAHULUAN

Senyawa antioksidan alami dari berbagai tanaman telah banyak dibuktikan khasiatnya guna mencegah berbagai kerusakan oksidatif dan penyakit yang melibatkan reaksi radikal bebas. Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (SOR) terlibat dalam patogenesis berbagai penyakit, termasuk atherosklerosis (Kehrer, 1993).

Senyawa antioksidan tersebut antara lain asam kafeat pada biji kopi (Moon dan Terao, 1998), gingerol, shogaol dan zingeron pada ekstrak jahe (Fuhrman et al., 2000; Septiana, 2001), kurkumin pada kunyit dan bangle (Mashuda et al., 1998; Nagano et al., 1997), serta γ -oryzanol pada bekatul padi (Elliott, 1999; McCaskill dan Zhang, 1999).

Bahan-bahan yang berpotensi menyehatkan itu sangat baik jika digunakan menjadi produk makanan dan

minuman *nutraceutical* atau disebut dengan pangan fungsional. Bentuk pangan fungsional yang populer adalah minuman.

Penelitian ini mempelajari aktivitas antioksidan γ -oryzanol yang terkandung dalam bekatul. Xu et al., (2001) menunjukkan aktivitas antioksidan γ -oryzanol lebih kuat dibandingkan vitamin E- yang juga banyak pada minyak bekatul-pada oksidasi kolesterol secara *in vitro*. Penelitian γ -oryzanol pada binatang percobaan dan manusia membuktikan bersifat hipokolesterolemik (Kahlon dan Chow, 1997). tetapi informasi mengenai aktivitas antioksidan γ -oryzanol untuk melindungi oksidasi lipoprotein dan sifat perlindungan terhadap sel hidup dari penderitaan akibat stres oksidatif belum ada.

Bekatul mempunyai sifat yang tidak menguntungkan yaitu mudah tengik. Untuk memperoleh bekatul yang tidak tengik dan sekaligus memperpanjang masa simpan, maka

bekatul harus diawetkan segera setelah diperoleh dari penggilingan padi. Kondisi teknik pengawetan yang optimal dengan menggunakan otoklaf dilakukan pada suhu 121°C selama 3 menit dan dilanjutkan dengan pengeringan menggunakan oven 100°C selama 1 jam (Damayanthi et al., 2003).

Dalam penelitian ini mula-mula dicoba efek perlindungan γ -oryzanol terhadap low density lipoprotein (LDL) yang oksidasinya diinisiasi oleh CuSO_4 . Halliwell (1992) menyatakan Cu bersifat pro-oksidan lebih kuat dibandingkan Fe. Sutanto (1996) menggunakan konsentrasi 5 μM di dalam penelitian oksidasi LDL. Kemudian dicoba efek perlindungan γ -oryzanol terhadap sel hidup limfosit manusia di bawah kondisi tanpa dan dengan stres oksidatif yang diinduksi oleh H_2O_2 menggunakan metode 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) untuk menentukan apakah γ -oryzanol mempunyai aksi perlindungan pada sel hidup di dalam kultur sel.

METODOLOGI

Tempat, waktu, bahan dan alat

Penelitian ini berlangsung di laboratorium kimia-biokimia Pusat Studi Pangan dan Gizi, laboratorium analisis umum PAU Ilmu Hayati, laboratorium analisis zat gizi di Jurusan Gizi Masyarakat dan Sumberdaya Keluarga, laboratorium virologi dan lipid pada Pusat Studi Satwa Primata yang seluruhnya berada di Institut Pertanian Bogor dan laboratorium imunologi pada US-Namru 2 di Jakarta. Penelitian berlangsung dari Mei sampai dengan Agustus 2001.

Gabah kering giling (GKG) dari padi varietas IR-64 diperoleh dari Balai Penelitian Padi di Sukamandi. GKG selanjutnya digiling, disosoh dan diawetkan menggunakan otoklaf lalu dikeringkan menggunakan oven sehingga diperoleh bekatul awet yang siap digunakan untuk tahap selanjutnya (Damayanthi et al., 2003).

Pada isolasi LDL dibutuhkan 150 ml darah segar dan bahan kimia natrium klorida (NaCl), asam etilendiamina-tetra asetat (EDTA), kalium bromida (KBr), natrium bikarbonat (NaHCO_3). Untuk analisis protein isolat digunakan serum albumin sapi (BSA), natrium karbonat (Na_2CO_3), natrium hidroksida (NaOH), tembaga sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kalium tartrat, reagen folin-ciocalteau. Untuk analisis malonaldehid (MDA) isolat digunakan 1,1,3,3 - tetraetoksipropana (TEP), dan asam tiobarbiturat (TBA). Kondisi stres oksidatif isolat digunakan CuSO_4 .

Pada isolasi limfosit dibutuhkan darah manusia dan *histopaque*. Untuk kultur sel limfosit dan analisis MTT dibutuhkan medium serbuk roosevelt park medical institute (RPMI)-1640 (Gibco BRL), serum janin sapi (SJS) (Sigma,

USA), phosphate buffer saline (PBS), gentamisin, NaHCO_3 , tripsin (Sigma, USA), EDTA, tryphan blue (Gurr), MTT reagen (Sigma, USA) dan HCl isopropanol.

Peralatan yang digunakan tabung konikal, sentrifuse, penangas air, tabung ultrasentrifuse polialomer (Beckman, 14 x 95 mm), ultrasentrifus Beckman XL-90 dengan rotor SW-40, pisau pengiris tabung, kantung dialisis, membran milipore 0,22 μm , spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer.

Untuk pemeliharaan sel dan kultur sel diperlukan inkubator CO_2 5% 37°C (merek NAPCO), hemasitometer, *Spectrofotometric Elisa Plate Reader*, laminar flow hood, flask 50 ml (merek Costar), mikroskop dan lempeng mikrokultur 96 sumur dasar datar.

Minuman model dan persiapan ekstrak uji

Minuman model disusun berdasarkan komposisi bekatul awet dan air sebanyak 220 ml (1 gelas). Kriteria yang digunakan adalah keenceran dari campuran bekatul dan air secara subyektif. Dari hasil pengamatan diperoleh 14 g bekatul awet digunakan untuk uji aktivitas antioksidan minyak bekatul dan fraksinya pada LDL dan 12 g untuk uji pada sel limfosit. Bekatul sebanyak 12-14 g ini kemudian dihitung berapa kandungan fraksi tak tersabunkan dan oryzanol.

Minyak diekstrak dari bekatul awet padi varietas IR-64 derajat sosoh 13 % (Xu dan Godber, 1999), sedangkan fraksi tak tersabunkan diperoleh dari pemisahan minyak (Bourgeois, 1992). Oryzanol yang disuplementasi pada uji menggunakan sel limfosit manusia merupakan oryzanol standard dari Rice Grower's Australia, sedangkan oryzanol yang disuplementasi ke isolat LDL adalah hasil semipurifikasi menggunakan khromatografi lapis tipis (KLT) dan oryzanol standard.

Pembuatan dan suplementasi minyak bekatul dan fraksinya

Perhitungan konsentrasi sampel menggunakan asumsi bahwa minuman bekatul model dikonsumsi seseorang lalu diencerkan oleh darah tubuh sebanyak 6 liter. Konsentrasi tersebut setara dengan jumlah ekstrak yang masuk ke dalam 8 ml plasma darah manusia (uji menggunakan LDL) atau 175 μl larutan kultur sel (uji menggunakan sel limfosit). Konsentrasi itu adalah konsentrasi C2 (Tabel 1), yaitu berturut-turut untuk sampel minyak, tak tersabunkan dan oryzanol adalah 24,68 mg/ml; 1,86 mg/ml dan 0,42 mg/ml. Konsentrasi lainnya adalah bertingkat yaitu C1 ($\frac{1}{2}$ C2), C3 (2 C2), C4 (4 C2), dan C5 (8 C2).

Sampel yang dipakai pada uji LDL : 1) Kontrol, 2) Minyak bekatul awet IR-64, C2 = 308,3 $\mu\text{g/ml}$ plasma, 3) Fraksi tak tersabunkan IR-64, C2 = 22,2 $\mu\text{g/ml}$ plasma,

4) Oryzanol IR-64, C2 = 5,2 µg/ml plasma, 5) Oryzanol IR-64, C3 = 10,4 µg/ml plasma dan 6) Oryzanol standar, C3 = 10,4 µg/ml plasma.

Untuk percobaan menggunakan sel limfosit minyak dilarutkan dalam etanol (residu pada kultur 0,06 %), sedangkan fraksi tak tersabunkan dan oryzanol dilarutkan dalam etil asetat (residu pada kultur 0,72 %). Setelah itu bahan dilarutkan ke dalam RPMI-1640 sehingga konsentrasi akhir sampel di dalam sumur untuk C1, C2, C3, C4 dan C5 berturut-turut untuk minyak adalah 133,2 ; 266,5 ; 533,0 ; 1.066,0 dan 2.132,0 µg/ml; untuk fraksi tak tersabunkan 9,6 ; 19,2 ; 38,4 ; 76,8 dan 153,6 µg/ml; untuk oryzanol 2,4 ; 4,7 ; 9,4 ; 18,8 dan 37,7 µg/ml.

Pada uji menggunakan isolat LDL, plasma disuplementasi dengan 100 µl ekstrak uji dan tween 20 sebesar 1 % lalu diinkubasi pada 37°C 3 jam. Pada uji menggunakan sel limfosit, suplementasi dilakukan dengan menambahkan sampel sebanyak 25 µl ke dalam 175 µl kultur limfosit .

Pengambilan darah segar

Darah segar 150 ml untuk uji aktivitas antioksidan pada LDL diperoleh dari seorang laki-laki dewasa sehat yang telah berpuasa 12 jam sebelumnya (Suzukawa et al., 1994; Septiana, 2001). Darah disentrifuse dengan kecepatan 2700 rpm (1700 g) selama 30 menit, 4°C. Plasma darah dipisahkan, lalu dipakai dalam isolasi LDL.

Darah segar untuk uji aktivitas antioksidan pada sel limfosit diperoleh dari seorang perempuan dewasa sehat. Setelah pengambilan darah, dilakukan isolasi dan persiapan suspensi limfosit (Immunology Series No. 8- Procedural Guide, 1978).

Persiapan pengujian aktivitas antioksidan dengan LDL manusia

Isolasi LDL manusia (Sulistiyani dan St. Clair, 1991)

Ke dalam masing-masing plasma yang telah disuplementasi berbagai ekstrak ditambahkan 5 ml NaCl 0,9 % - EDTA 0,01 % (w/v). Contoh disentrifuse 36.000 rpm (164.000 g) 4°C 20 jam. Fraksi β-very low density lipoprotein (VLDL) yang berada pada bagian atas dipisahkan sehingga diperoleh fraksi LDL dan high density lipoprotein (HDL). Larutan fraksi LDL dan HDL disentrifuse 36.000 rpm (164.000 g) 4°C 24 jam. Fraksi LDL diambil setelah tabung polialomer dipotong dengan pisau pada bagian batas bawah.

Masing-masing fraksi LDL yang didapat, dimasukkan ke dalam kantung dianalisis lalu direndam dalam larutan dialisis I yaitu NaCl 0,9 % - EDTA 0,01 % pH 7,4 selama 72 jam suhu 4°C. Selanjutnya contoh diambil

dan disaring dengan membran milipore 0,45 µm lalu dimasukkan ke dalam kantung dialisis yang baru.

Larutan didialisis dalam larutan dialisis II : NaCl 0,9 %-NaHCO₃ 8,4x 10⁻³ % (1mM) pH 7,4 pada suhu 4°C 72 jam. Isolat LDL yang diperoleh dianalisis kadar protein dengan metode Lowry et al., (1951) dan diencerkan sehingga isolat LDL mengandung 200 µg protein/ml (Hirano et al., 1997). Rancangan percobaan adalah rancangan acak lengkap dan data diolah menggunakan program statistical analysis system (SAS).

Pengujian aktivitas antioksidan dengan isolat LDL

Contoh LDL (200 µg protein/ml) dipindahkan ke tabung reaksi. Isolat LDL dioksidasi oleh Cu²⁺ 5 µM (Sutanto, 1996). Setelah proses oksidasi selesai sampel dianalisis kadar MDA menggunakan spektrofotometer (Conti et al., 1991).

Persiapan pengujian aktivitas antioksidan dengan limfosit

Tujuan penelitian adalah mempelajari pengaruh proteksi fraksi minyak bekatul awet terhadap aktivitas proliferasi limfosit tanpa dan dengan stres oksidatif secara *in vitro*. Sebanyak 100 µl suspensi sel 2,3 x 10⁶ sel/ml dimasukkan ke dalam lempeng mikrokultur. Kemudian ditambahkan *phytohaemagglutinin* (PHA) 10 µl, H₂O₂ 10 µl, RPMI yang mengandung SJS 12,1 % dan ekstrak minyak bekatul, fraksi tak tersabunkan dan oryzanol masing-masing sebanyak 25 µl sehingga volume total di sumur adalah 175 µl. Kultur diinkubasi pada inkubator 37°C, 5 % CO₂, RH 90 % 5 hari.

Uji aktivitas antioksidan minyak bekatul dan fraksinya pada limfosit

Mula-mula dilakukan penentuan kondisi kultur sel limfosit, dan hasil yang diperoleh adalah lama inkubasi kultur sel limfosit selama 5 hari; konsentrasi H₂O₂ yang toksik untuk kultur limfosit 3 mM; dan waktu suplementasi ekstrak uji pada kultur stres oksidatif 30 menit sebelum penambahan H₂O₂.

Kultur limfosit (tahap 4) dibuat dengan dan tanpa H₂O₂. Volume ekstrak uji 25 µl dan volume total kultur 175 µl. Pengukuran dan perhitungan Indeks Stimulasi (IS) menggunakan metode MTT (Coligan et al., 1992). Absorbansi masing-masing sumur diukur dengan Elisa Reader pada λ 570 nm dengan rumus :

$$IS = \frac{OD \text{ yang distimulasi dengan ekstrak}}{OD \text{ pada kontrol}}$$

Perhitungan kapasitas relatif

Dihitung dengan membandingkan hasil masing-masing parameter dari minyak dan fraksi tak tersabunkan terhadap oryzanol dikalikan rendemen minyak dan fraksi tak tersabunkan terhadap rendemen oryzanol. Parameter adalah aktivitas antioksidan melalui pengukuran kandungan MDA pada isolat LDL dan VLDL.

Perhitungan kapasitas relatif untuk aktivitas antioksidan (MDA)

=(rasio pengurangan kadar MDA perlakuan dengan oryzanol bekatul 5,2 µg/ml plasma) x (rasio rendemen perlakuan dengan oryzanol bekatul 5,2 µg/ml plasma).

% pengurangan kadar MDA = (konsentrasi MDA ekstrak – konsentrasi MDA kontrol) x 100%.

Untuk perhitungan kapasitas relatif pada uji menggunakan isolat LDL/VLDL oryzanol bekatul padi awet varietas IR-64 5,2 µg/ml plasma sebagai patokan. Rancangan acak lengkap faktorial dilakukan dengan tiga kali ulangan. Data absorbansi diolah dengan pendekatan persamaan regresi dengan program SAS.

HASIL PEMBAHASAN

Penghambatan pembentukan malonaldehid di lipoprotein densitas rendah (LDL) oleh minyak bekatul padi awet

Konsentrasi minyak dan fraksinya yang digunakan dalam penelitian ini didasarkan minuman model. Penelitian ini berupaya untuk mendekati ke aplikasi sehari-hari, yaitu pada banyaknya bekatul yang terdapat dalam segelas minuman kesehatan yang diminum sehari. Rendemen ekstraksi minyak dan fraksinya, serta konsentrasi masing-masing bahan uji untuk yang setara dengan konsumsi per hari dapat dilihat pada Tabel 1.

Jumlah bekatul pada pengujian dengan LDL 14 g, sedangkan pada limfosit sebanyak 11,6 g.

Kadar protein LDL 852,20 – 2734,7 µg/ml. Pemberian minyak bekatul dan fraksinya berpengaruh sangat nyata terhadap kadar protein LDL ($\alpha=0.05$). LDL yang diberi perlakuan minyak bekatul dan fraksinya semuanya memiliki kadar protein yang sama dengan kontrol, kecuali yang diberi oryzanol bekatul padi awet varietas IR-64 pada konsentrasi 5,2 dan 10,4 µg/ml plasma. Kadar protein yang beragam pada LDL ini disebabkan oleh pengenceran selama dua kali proses dialisis.

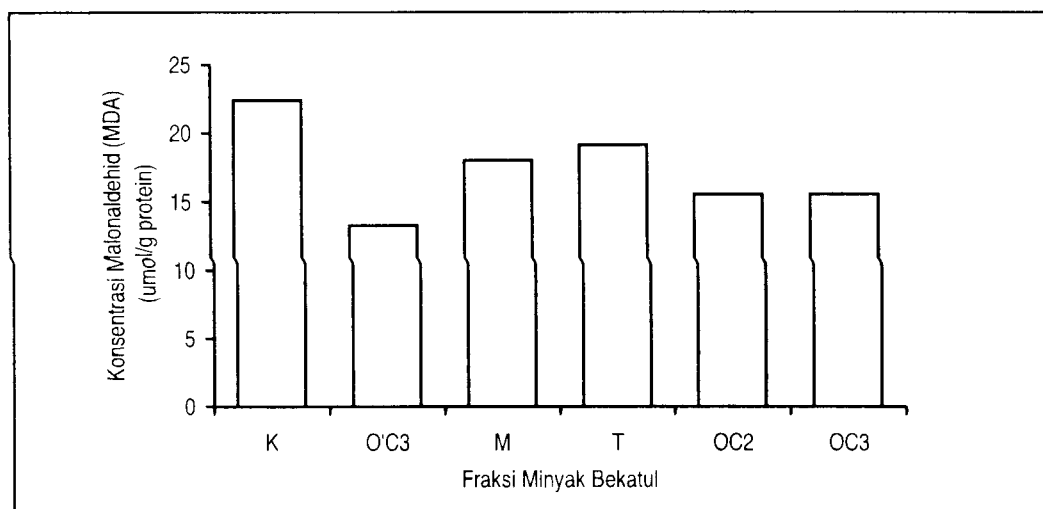
Hasil analisis konsentrasi malonaldehid dari LDL dapat dilihat pada Gambar 1 dan Tabel 2. Pengurangan kadar malonaldehid dari kontrol berkisar antara 14,80-41,00%. Pengurangan kadar malonaldehid dari kontrol terjadi pada LDL yang terendah adalah yang diberi perlakuan fraksi tak tersabunkan 22,2 µg/ml plasma.

Konsentrasi fraksi minyak bekatul di sampel berpengaruh sangat nyata terhadap kadar malonaldehid LDL ($\alpha=0.05$). Malonaldehid LDL yang diberi perlakuan oryzanol standar 10,4 µg/ml plasma, minyak 309 µg/ml plasma, oryzanol IR-64 5,2 µg/ml plasma dan oryzanol IR-64 10,4 µg/ml plasma memiliki kadar yang lebih rendah secara nyata bila dibandingkan dengan kontrol, sedangkan malonaldehid LDL kontrol dan malonaldehid yang diberi fraksi tak tersabunkan 22,2 µg/ml plasma memiliki kadar yang sama ($\alpha=0.05$). Malonaldehid LDL yang diberi oryzanol standar 10,4 µg/ml plasma, oryzanol IR-64 5,2 µg/ml plasma dan oryzanol IR-64 10,4 µg/ml plasma memiliki kadar malonaldehid LDL yang sama ($\alpha=0.05$). Malonaldehid pada fraksi tak tersabunkan dengan minyak tidak berbeda nyata.

Tabel . Rendemen dan konsentrasi ekstrak minyak bekatul dan fraksinya

Ekstrak	Rendemen (%)	C2 (mg/ml) konsentrasi ekstrak di sampel	C2 (µg/ml) Konsentrasi ekstrak di Plasma
Uji pd Isolat VLDL/LDL			
Minyak	13,72 % dari bekatul	24,68	309,00
Tak tersabunkan	7,20 % dari minyak atau 0,95 % dari bekatul	1,86	22,20
Oryzanol	1,7 % dari minyak atau 0,22 % dari bekatul	0,42	5,24
Uji pd limfosit :			di Sumur
Minyak	13,22 % dari bekatul	1,87	266,50
Tak tersabunkan	7,20 % dari minyak atau 0,95 % dari bekatul	0,13	19,20
Oryzanol	1,7 % dari minyak atau 0,22 % dari bekatul	0,03	4,72

C2 : konsentrasi sampel yang setara dengan yang minuman bekatul model sehari
C1, C3, C4, C5 = (½, 2, 4, 8) x C2



K = kontrol + Cu. O'C3 = oryzanol standar 10,4 ul/ml plasma, M = minyak 309 µg/ml plasma, T = tak tersabunkan 22,2 µg/ml plasma, OC2 = oryzanol IR-64 5,2 µg/ml, OC3 = Oryzanol IR-64 10,4 µg/ml plasma

Gambar 1. Pengaruh perlindungan fraksi minyak bekatul terhadap pembentukan malonaldehid (MDA) pada oksidasi LDL manusia yang disuplementasi dengan minyak bekatul dan fraksinya

Tabel 2. Konsentrasi malonaldehid dari LDL yang disuplementasi minyak bekatul dan fraksinya

Konsentrasi Fraksi minyak bekatul di sampel	Konsentrasi MDA (µmol MDA/g protein) ± SDV	Pengurangan konsentrasi MDA dari kontrol (%)	Yield (%)	Kapasitas relatif
1. Kontrol + Cu	22,44 ± 0,31	-	-	
2. Oryzanol standar 10,40 µg/ml plasma	13,24 ± 0,57	41,00	0,22	1,32
3. Minyak 309 µg/ml plasma	17,99 ± 0,46	19,83	13,2	3,88
4. Tak tersabunkan 22,2 µg/ml plasma	19,12 ± 4,65	14,80	0,95	2,09
5. Oryzanol IR-64 5,2 µg/ml plasma	15,51 ± 0,50	30,88	0,22	1
6. Oryzanol IR-64 10,4 µg/ml plasma	15,51 ± 2,81	30,88	0,22	1

Semua fraksi minyak bekatul menunjukkan dapat menghambat oksidasi LDL namun dengan kemampuan yang tidak sama. Kemampuan penghambatan ini paling besar ditunjukkan oleh γ -oryzanol yang telah disempurnifikasi dari bahan tak tersabunkan. Kemampuan antioksidan tampaknya lebih efektif jika dalam keadaan murni dibandingkan dalam bentuk tak tersabunkan atau minyak dalam konsentrasi oryzanol yang sama. Hal ini mungkin pada bentuk minyak malonaldehid dapat pula berasal dari minyak bekatul yang rusak, sedangkan pada tak tersabunkan kandungan vitamin E yang tinggi dapat juga bersifat sebagai pro-oksidan. Di samping itu diduga ada komponen lain yang belum diketahui pada bekatul murni yang mempunyai sifat dapat meningkatkan aktivitas antioksidan.

Oryzanol diidentifikasi terdiri atas 10 komponen dengan struktur kimia yang berbeda (Xu et al., 2001). Pada penelitian ini tidak dilakukan uji kemurnian oryzanol,

sehingga tidak diketahui oryzanol yang mana yang terdapat dalam sampel uji. Aktivitas antioksidan oryzanol tergantung pada struktur kimianya, aktivitas tertinggi diberikan oleh 24-methylenecycloartanyl ferulate. Fungsi antioksidan tergantung pada gugus hidroksi fenolik di bagian ferulat pada strukturnya. Asam ferulat dilaporkan merupakan jenis antioksidan asam fenolik karena adanya gugus hidroksi pada cincin fenolik. Perlu kiranya di masa mendatang ditentukan kemurnian komponen oryzanol sebagai sampel uji dalam uji aktivitas antioksidan menggunakan LDL atau *in vivo*.

Dalam penelitian ini belum dapat diketahui bagaimana nasib oryzanol teroksidasi selanjutnya. Untuk sementara ini dengan melihat struktur oryzanol yang mirip dengan tokoferol maka diharapkan nasib oryzanol radikal dapat dihilangkan oleh sistem perlindungan terhadap radikal bebas yang berada di tubuh.

LDL mengandung protein sebanyak 21 % dan lipid 79 % (Marinetti, 1990). Apoprotein B-100 merupakan protein utama pada LDL yang dapat teroksidasi oleh pro-oksidan yang digunakan dalam penelitian ini dan oleh radikal bebas dalam produk peroksidasi lipid seperti hidroperoksida asam lemak, produk aldehid dari dekomposisi hidroperoksida (Sevanian dan Bolger, 1996). LDL yang termodifikasi oleh oksidasi ini akan bertanggung jawab pada awal mula terjadinya atherosklerosis.

Kapasitas relatif protein LDL pada suplementasi minyak 309 µg/ml paling tinggi (3,88). Hal ini menunjukkan bahwa minyak 4 kali lebih baik digunakan sebagai bahan baku fungsional dibandingkan komponen bioaktif yang telah dipurifikasi (oryzanol). Demikian pula fraksi tak tersabunkan (2.09) lebih baik 2 kali dibandingkan oryzanol sebagai bahan baku fungsional.

Pengaruh minyak bekatul awet dan fraksinya terhadap limfosit dalam kondisi dengan dan tanpa stres oksidatif.

Stimulasi limfosit dengan antigen atau mitogen mengakibatkan berbagai reaksi biokimia di dalam sel, di antaranya fosforilasi nukleoprotein, pembentukan DNA dan RNA, serta peningkatan metabolisme lemak dan lain-lain. Aktivitas sel T dan B berproliferasi ini dapat diukur melalui Indeks Stimulasi (Zakaria et al., 2000).

Stimulasi adalah proses perbanyakan sel melalui pembelahan sel melalui pembelahan sel atau mitosis sebagai respon terhadap antigen atau mitogen. Pada proses tersebut dihasilkan sel-sel efektor aktif yang berperan pada respons spesifik dan atau non spesifik untuk eliminasi mikroorganisme patogen dan zat asing lainnya. Stimulasi merupakan fungsi dasar biologis limfosit (Rosse et al., 1994) dan respons stimulasi secara *in vitro* dapat menggambarkan fungsi limfosit.

Hasil respon stimulasi limfosit yang ditunjukkan dengan Indeks Stimulasi (IS) akibat pemberian fraksi minyak bekatul pada kondisi tanpa dan dengan H₂O₂ ditunjukkan pada Gambar 2. Limfosit mampu memberikan respon terhadap stimulasi oleh mitogen PHA.

Indeks Stimulasi (IS) pada pemberian minyak bekatul 1,52 – 1,86. Dibandingkan dengan RPMI + etanol yaitu 1,76, pemberian minyak cenderung sedikit menekan proliferasi limfosit. IS pada pemberian bahan tak tersabunkan 1,22 – 1,61, dibandingkan dengan RPMI + etil asetat yaitu 1,73, pemberian bahan tak tersabunkan sedikit lebih besar menekan proliferasi limfosit dibanding pada pemberian minyak. IS pada pemberian oryzanol 1,67 – 1,88. IS pada RPMI + pelarut etanol atau etil asetat jika dibandingkan antara dengan dan tanpa pemberian H₂O₂, terlihat IS yang diberi H₂O₂ lebih rendah dibandingkan tanpa H₂O₂. Hal ini menunjukkan bahwa H₂O₂ bersifat toksik terhadap sel limfosit.

H₂O₂ suatu senyawa oksigen reaktif yang non radikal bersifat dapat menembus membran sel dengan mudah dan dapat menyerang beberapa sasaran di sel. Peningkatan adanya H₂O₂ akan menyebabkan kerusakan radikal hidroksil, misalnya bereaksi dengan ion logam transisi. Stres oksidatif dapat menghasilkan perubahan metabolisme di dalam tubuh, seperti perubahan DNA, peningkatan Ca²⁺ bebas di intraseluler, kerusakan tranporter ion membran dan protein spesifik dan peroksidasi lipid. H₂O₂ akan menyerang merusak secara langsung dengan mengoksidasi grup tiol. Kelebihan peningkatan Ca²⁺ dapat mengaktifasi protease dan nuklease (memotong DNA) (Halliwell et al., 1992).

Hanya kondisi kultur dengan dan tanpa stress oksidatif berpengaruh secara nyata terhadap IS ($\alpha = 0.05$). Kondisi stres oksidatif menurunkan secara nyata IS kultur limfosit. Mekanisme kerusakan sel yang dimediasi oleh oksidan H₂O₂ (hidrogen peroksida) telah dilaporkan oleh Hyslop et al., (1988). Sel P 388 D1 yang dipapar H₂O₂ mengalami kerusakan melalui terjadinya penghambatan fosforilasi ADP oleh glikolisis dan mitokondria. Glikolisis spesifik dihentikan aktivitas pada tahap gliseraldehid-3-fosfat dihidrogenase oleh 3 mekanisme yang tidak tergantung : a) inaktivitas langsung enzim intraseluler, b) reduksi konsentrasi intraseluler dan potensial redoks dari kofaktor nikotinamid, dan c) pH sitosolik optimal dari enzim.

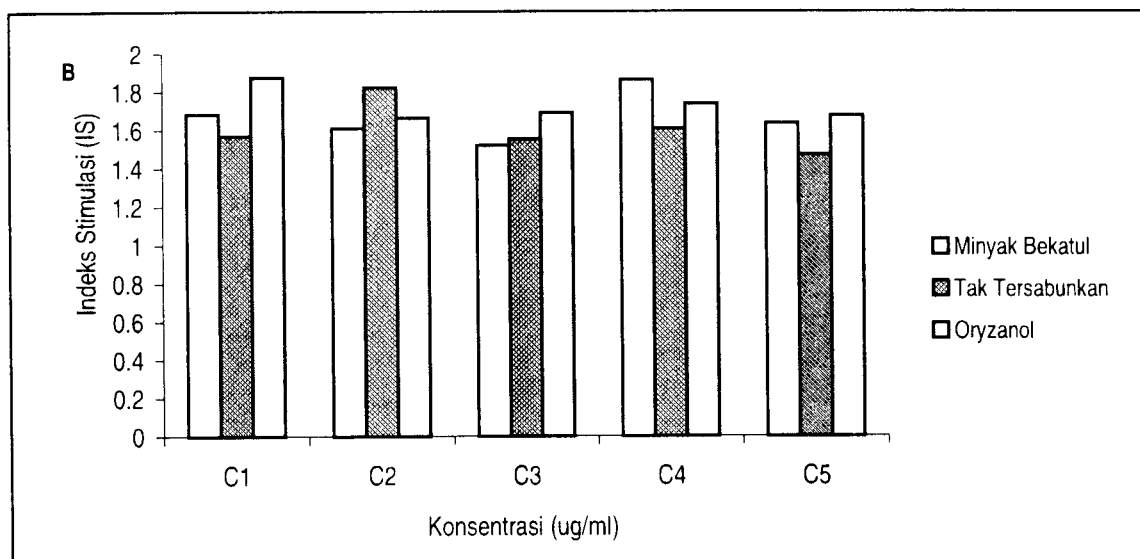
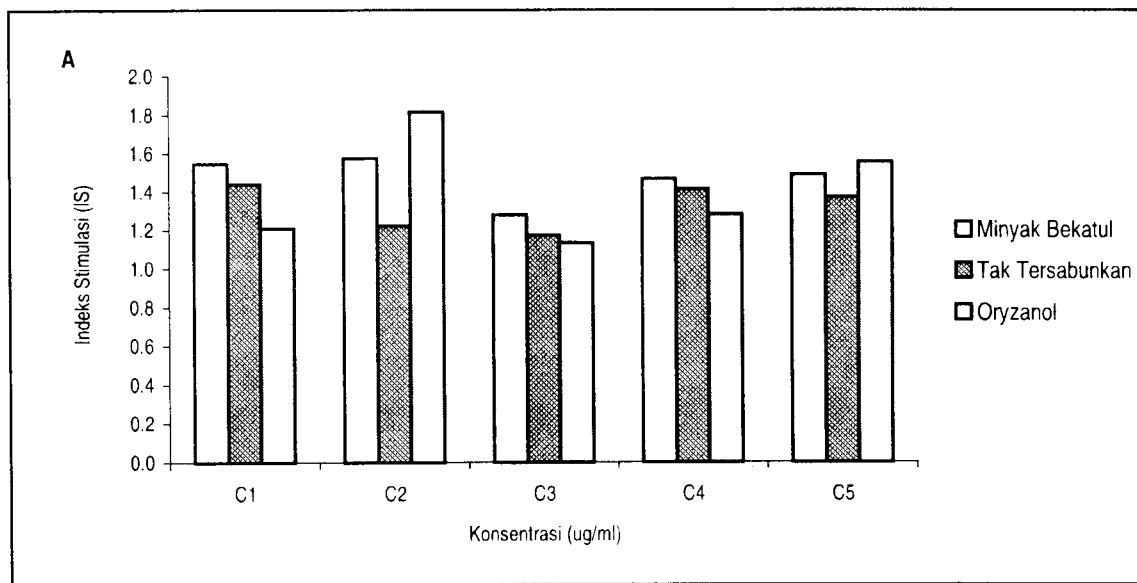
Pemberian minyak bekatul padi dan fraksinya pada konsentrasi bertingkat menunjukkan tidak berpengaruh secara nyata terhadap IS dibandingkan dengan kontrol (RPMI + PHA) ($\alpha = 0,05$). Sebenarnya banyak laporan bahwa bahan antioksidan alami pada berbagai tumbuhan dapat melindungi limfosit dari kerusakan stress oksidatif. Namun dalam penelitian ini pemberian minyak bekatul dan fraksinya menunjukkan belum dapat memberikan pengaruh terhadap IS sel limfosit manusia.

Promotor pro-oksidan selain CuSO₄ yang bersifat lebih kuat dibandingkan Fe adalah H₂O₂. Di dalam tubuh makhluk hidup Cu jarang terdapat bebas sehingga tubuh terlindungi dari kerusakan jaringan akibat radikal bebas (Halliwell et al., 1992). Dalam penelitian digunakan H₂O₂ dan sel limfosit sebagai model untuk melihat aktivitas antioksidan oryzanol terhadap sel normal dalam keadaan stres oksidatif. H₂O₂ terbentuk di dalam tubuh antara lain akibat reaksi superoksid dismutase yang merubah superoksid oksigen menjadi oksigen dan H₂O₂.

Jika dilihat dari pemanfaatan bekatul yang lebih realistis, yaitu dengan mempertimbangkan tidak saja pada sifat antioksidan namun juga pada kelayakan ekonomisnya, maka pemanfaatan dalam bentuk minyak kasar lebih baik daripada bentuk lebih murninya. Hal ini ditunjukkan oleh nilai kapasitas relatif yang lebih besar pada minyak kasar dan kemudian fraksi tak tersabunkan dibandingkan oryzanol. Ekstraksi, semipurifikasi dan isolasi merupakan

proses yang membutuhkan sumberdaya yang besar. Oleh karena itu dalam bentuk minyak kasar atau tepung bekatul awet (keseluruhan) merupakan bentuk yang patut dipertimbangkan. Komponen-komponen lain selain oryzanol pada bekatul telah dilaporkan memiliki khasiat

yang tidak kalah. Komponen-komponen tersebut adalah seperti asam lemak tak jenuh esensial (oleat dan linoleat), vitamin B dan E, serat pangan dan bahkan fitin (Jariwalla, 2002).



Keterangan:

C2 = Konsentrasi akhir bahan di dalam kultur yang setara dengan konsumsi minuman

Bekatul model per hari mengandung 11,6 g bekatul

C1, C3, C4 dan C5 berturut-turut ½, 2, 4 dan 8 kali C2

C2 minyak = 267 µg/ml ; C2 tak tersabunkan = 19,2 µg/ml ; C2 oryzanol = 4,7 µg/ml

Gambar 2. Pengaruh fraksi minyak bekatul awet terhadap limfosit dalam kondisi dengan (A) dan tanpa H₂O₂ (B)

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Minyak bekatul padi IR-64 dan fraksinya (fraksi tak tersabunkan dan oryzanol) yang diperoleh dari ekstraksi bekatul awet pada konsentrasi setara dengan segelas minuman bekatul model terbukti dapat menghambat oksidasi LDL manusia secara *in vitro*. Hal ini ditunjukkan oleh rendahnya kandungan malonaldehid LDL yang plasmanya telah disuplementasi minyak bekatul dan fraksinya dibandingkan kontrol. Aktivitas antioksidan oryzanol lebih tinggi dibandingkan fraksi tak tersabunkan dan kemudian minyak. Tetapi kapasitas relatif aktivitas antioksidan paling besar ditunjukkan oleh minyak kasar, disusul fraksi tak tersabunkan dan oryzanol.

Minyak bekatul padi dan fraksinya dalam penelitian ini pada konsentrasi 8 kali konsentrasi setara dengan segelas minuman bekatul model belum dapat menstimulasi proliferasi sel limfosit manusia *in vitro*. Pada kultur yang dengan dan tanpa H₂O₂, suplementasi minyak bekatul dan fraksinya tidak bersifat sitotoksik terhadap limfosit manusia. Namun pemberian H₂O₂, sebesar 3 mM bersifat sitotoksik bagi sel limfosit.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kelarutan, ketengikan, citarasa bekatul di dalam minuman fungsional. Untuk meningkatkan nilai ekonomis bekatul yang rendah perlu dilakukan upaya-upaya yang lebih terintegrasi untuk lebih mengoptimalkan pemanfaatan bekatul untuk bahan pangan fungsional dalam bentuk yang lebih konkrit.

DAFTAR PUSTAKA

- Bourgeois C.** 1992. Determination of Vitamin E : Tocopherols and Tocotrienols. London : Elsevier applied science. hlm 15-18.
- Coligan J.E., Kruisbeek A.M., Margulies D.H., Shevach E.M. and Strober W, editor.** 1992. Current Protocols in Immunology. Volume ke-1. National Institutes of Health. New York: John Wiley & Sons. Bagian 6,3,6.
- Conti M, Morand P.C., Levillain P. and Lemonier A.** 1991. Improved Fluorimetric Determination of Malonaldehyde. Clin Chem. 37:1273-1275.
- Damayanthi E, Muchtadi D, Zakaria F.R., Syarif H, Wijaya C.H. dan Damardjati D.S.** 2003. Pengaruh Derajat Sosoh terhadap Kandungan Gizi, Serat Pangan dan Oryzanol Bekatul Padi (*Oryza sativa*) Awet. Media Gizi dan Keluarga 27 (1) : 104-114.
- Ellot J.G.** 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. Food Technology. 53 (2) : 46-49.
- Fuhrman B, Rosenblat M, Hayek T, Coleman R. and Aviram M.** 2000. Ginger Extract Consumption Reduces Plasma Cholesterol, Inhibits LDL Oxidation and Attenuates Development of Atherosclerosis in Atherosclerotic, Apolipoprotein E-Deficient Mice. American Society for Nutritional Sciences. P:1124-1131.
- Halliwell B, Gutteridge J.M.C. and Cross C.E.** 1992. Free radicals, antioxidants and human disease: Where are we now ? J. Lab. Clin Med. 119 (6) : 598 – 620.
- Hirano R, Kondo K, Iwamoto T, Igarashi O and Itakura H.** 1997. Effects of antioxidants on the oxidative susceptibility of low-density lipoprotein. J. of Nutr. Sci. Vitaminol. 43 : 435-444.
- Hyslop P.A., Hinshaw D.B., Halsey W.A., Schraufstatter I.U., Sauerherber R.D., Spragg R.G., Jackson J.H. and Cochrane C.G.** 1988. Mechanisms of oxidant-mediated cell injury. The glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide. J. Biol.Chem. Feb 5;263 (4): 1665-75.
- Jariwalla R.J.** 2002. Add some rice-based products to your life. Advances in rice-based products with potential benefits to health. <http://www.thehormoneshop.com/oryzanol.htm>
- Kahlon T.S. and Chow F.I.** 1997. Hypercholesterolemic Effects of Oat, Rice and Barley Dietary Fibers and Fractions. Cereal Foods World. 42 (2) : 86-92.
- Kehrer J.P.** 1993. Free radicals as mediator of tissue injury and disease. Critical Reviews in Toxicology 23(1) : 21-48.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.** 1951. Protein measurement with folin phenol reagen. J. Biol. Chem. 193 : 265.
- Marinetti G.V.** 1990. Disorder of Lipid Metabolism. New York : Plenum Press.
- Mashuda T, Matsumura H, Oyama Y, Takeda Y, Jitoe A, Kida A, Hidaka K.** 1998. Synthesis of (±) – cassuminins A and B, new curcuminoid

- antioxidants having protective activity the living cell against oxidative damage. *J. Nat. Prod.* 61 : 609-613.
- McCaskill D.R. and Zhang F. 1999.** Use of rice bran oil in foods. *Food Technology.* 53 (2) : 50-53.
- Moon J.H. and Terao J. 1998.** Antioxidant activity of caffeic acid and dihydrocaffeic acid in lard and human low-density lipoprotein. *J. Agric. Food Chem.* 46 : 5062-5065.
- Nagano T., Oyama Y., Kajita N., Chikakahisa L., Nakata M., Okazaki E and Masuda T. 1997.** New curcuminoid isolated from *Zingiber cassumunar* protect cell suffering from oxidative stress: A flow-cytometric study using rat thymocytes and H₂O₂. *J. Pharmacol.* 75 : 363-370.
- Rosse N.R., de Macario E.C., Fahey .J.L., Friedman H and Penn G.M. 1994.** Manual of Clinical Laboratory Immunology. Washington, D.C : American Society for Microbiology.
- 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]. Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
- Sevanian A and Bolger M.B. 1996.** Dietary approaches to lowering cholesterol. <http://www.usc.edu/hsc/pharmacy/ced/dietchol/dietchl2.htm>. [14 Februari 2002].
- Sulistiyan and St. Clair, R.W. 1991.** The method of Isolation of primary cells and their statement of LDL receptors on pigeon and chicken embryo cells in culture. *Atherosclerosis* 91 : 123-135.
- Sutanto J. 1996.** Pengaruh isoflavon pada resistensi lipoprotein berdensitas rendah (LDL) terhadap oksidasi kimiawi. [Skripsi]. Jurusan Kimia, FMIPA-IPB. Bogor.
- Suzukawa M, Abey M, Clijton P and Nestel P.J. 1994.** Effect of supplementing with vitamin E on the uptake of low density lipoprotein and the stimulation of cholesteryl ester formation in Macrophages. *Atherosclerosis Journal.* April 110 : 77-86
- Xu Z, Godber J.S. 1999.** Purification and identification of components of γ -oryzanol in rice bran oil. *J. Agric. Food Chem.* 47 : 2724-2728.
- Xu Z, Hua and Godber J.S. 2001.** Antioxidant Activity of Tocopherols, Tocotrienol, and Gamma-Oryzanol Components from Rice Bran against Cholesterol Oxidation Accelerated by 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) Dihydrochloride. *J. Agric. Food Chem.* 49 : 2077-2081.
- Zakaria F.R., Irawan B, Pramudia S.M. dan Sanjaya. 2000.** Intervensi sayur dan buah pembawa vitamin C dan Vitamin E meningkatkan sistem imun populasi buruh pabrik di Bogor. *Bul. Teknol. dan Industri Pangan.* 11(2) : 21-27.