

Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
Dr. apt. Mochammad Saiful Bachri, S.Si., M.Si.
Dr. drh. Sapto Yuliani, MP.

Antioksidan dan Stres Oksidatif



Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
Dr. apt. Mochammad Saiful Bachri, S.Si., M.Si.
Dr. drh. Sapto Yuliani, MP.

Antioksidan dan Stres Oksidatif

UAD
P R E S S

**Sanksi Pelanggaran Pasal 113
Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014
Tentang Hak Cipta**

1. Setiap orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
3. Setiap orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk penggunaan secara komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
4. Setiap orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp. 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

Antioksidan dan Stres Oksidatif

Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si.
Dr. apt. Mochammad Saiful Bachri, S.Si., M.Si.
Dr. drh. Sapto Yuliani, MP.

UAD
P R E S S

ANTIOKSIDAN DAN STRES OKSIDATIF

Copyright © 2023 Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si., dkk.

Penulis : **Nurkhasanah**
Mochammad Saiful Bachri
Sapto Yuliani
Editor : **Giriani Ayu Sabilla**
Layout : **Kirman**
Desain Cover : **Hafidz Irfana**

Diterbitkan oleh : **UAD PRESS**
(Anggota IKAPI dan APPTI)
Alamat Penerbit:
Kampus II Universitas Ahmad Dahlan
Jl. Pramuka No. 46, Sidikan, Umbulharjo, Yogyakarta.
Telp. (0274) 563515, Phone (+62) 882 3949 9820

ISBN : **978-623-5635-85-9**

16 x 24 cm, xiv + 182 hlm
Cetakan Pertama, Maret 2023

All right reserved. Semua hak cipta © dilindungi undang-undang. Tidak diperkenankan memproduksi ulang atau mengubah dalam bentuk apa pun melalui cara elektronik, mekanis, fotocopy, atau rekaman sebagian atau seluruh buku ini tanpa izin tertulis dari pemilik hak cipta.

Prakata

*A*lhamdulillah, segala puji bagi Allah, Zat yang Maha Mengetahui, atas limpahan rahmat dan karunianya sehingga buku ini dapat terselesaikan. Sholawat beriring salam semoga senantiasa terlimpah curahkan kepada baginda Rasulullah Muhammad SAW, karena berkat perjuangan beliau, kita berada dalam cahaya hidayah bagi kebahagiaan dunia dan akhirat.

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada banyak pihak yang telah memfasilitasi dan mendukung penyelesaian penulisan buku ini hingga penerbitannya. Semoga amal kebajikannya menjadi pemberat amal sholih.

Buku berjudul “Antioksidan dan Stres Oksidatif” ini ditulis untuk memberikan pemahaman tentang antioksidan dan perannya dalam kesehatan. Antioksidan adalah zat yang berperan sangat penting dalam pencegahan berbagai penyakit. Dalam tubuh, terdapat antioksidan endogen yang secara alami dibekalkan oleh Yang Maha Kuasa dalam setiap individu. Selain itu, ada juga antioksidan eksogen yang akan membantu kerja antioksidan endogen dalam menangkal oksidan yang ada dalam tubuh. Antioksidan ini akan menetralkan oksidan-oksidan seperti radikal bebas dan spesies-spesies oksigen reaktif yang berbahaya menjadi molekul yang lebih aman dan netral, seperti oksigen dan air.

Tingginya senyawa-senyawa reaktif dan oksidan dalam tubuh dapat menyebabkan berkembangnya penyakit-penyakit seperti diabetes, demensia, dan penyakit-penyakit degeneratif lainnya. Maka, antioksidan sangat erat kaitannya dengan pencegahan dan penghambatan progresi dari penyakit-penyakit tersebut. Buku ini juga membahas metode-metode pengujian antioksidan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang sangat berguna bagi para peneliti yang akan mengembangkan penelitian-penelitian tentang antioksidan. Buku ini juga diharapkan menjadi salah satu acuan pengembangan antioksidan dalam bidang kesehatan

Penulis menyadari, buku ini masih jauh dari sempurna. Masukan dan saran dari para pembaca yang membangun sangat diharapkan untuk penyempurnaannya.

Yogyakarta, 9 Februari 2023

Penulis

Daftar Isi

Prakata — *v*

Daftar Isi — *vii*

Daftar Tabel — *xi*

Daftar Gambar — *xii*

Bab 1 Antioksidan — *1*

A. Jenis-jenis Antioksidan — *3*

1. Berdasarkan Cara Kerja — *4*
2. Berdasarkan Sumbernya — *6*
3. Berdasarkan Asalnya — *9*

Bab 2 Radikal Bebas — *27*

A. Sumber Radikal Bebas — *29*

1. Radikal Endogen — *29*
2. Radikal Eksogen — *30*

B. Tahap Pembentukan Radikal Bebas — *31*

1. Tahap Inisiasi — *32*
2. Tahap Propagasi — *32*
3. Tahap Terminasi — *33*

C. Oksidan dan Dampak yang Ditimbulkan — *33*

1. Dampak Positif Oksidan — *34*

2. Dampak Negatif Oksidan — 35
 - D. Prooksidan — 35
 - E. *Reactive Species* — 41
 1. *Reactive Oxygen Species* (ROS) — 41
 2. *Reactive Nitrogen Species* (RNS) — 44
 - F. Stres Oksidatif — 47
- Bab 3 Analisis Antioksidan secara *In Vitro* — 51
- A. HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) — 53
 1. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Method*) — 53
 2. Metode TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter Method*) — 55
 3. ABTS *radical scavenging method*/TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) decolorization — 56
 4. *Crocin Bleaching Nitric Oxide Radical Inhibition Assay* — 59
 5. *Hydroxyl radical scavenging activity by p-butylsidiunethyl aniline* — 59
 6. *Scavenging of H₂O₂ radical* (Hydrogen Peroxide Scavenging Assay) — 60
 7. HORAC (*hydroxyl radical averting capacity*) — 61
 - B. ET (Electron Transfer) — 62
 1. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) — 63
 2. 1,1-diphenyl-porylhydrazil (DPPH) *free radical scavenging assay* — 64
 3. Copper (II) Reduction Capacity / CUPRAC Assay — 66
 4. Total phenols assay by Folin-ciocalteu — 68
 5. N-N-dimetyl-p-Phenylenediamine (DMPD) Assay — 70

- C. Metode Pengujian Lainnya — 72
 - 1. CAA (*Cellular Antioxidant Activity*) assay —72
 - 2. TLC Bioautography —74
 - 3. Chemiluminescence/Photochemiluminescence —77
 - 4. Enhanced Chemiluminescence —78

- Bab 4 Analisis Antioksidan secara *In Vivo* — 81
 - A. Uji Aktivitas Enzim SOD (*Superoksida Dismutase*) — 82
 - B. Uji Aktivitas Enzim Katalase — 86
 - C. Uji Aktivitas Enzim GPx (*Glutation Peroksidase*) — 88
 - D. LPO (*Lipid PerOxidation*) Assay — 90
 - E. Analisis Kadar MDA (*Malonaldehid*) — 92
 - 1. TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*) —93
 - 2. Pengukuran Kadar MDA Serum Bebas dengan Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) —95

- Bab 5 Penelitian Terkait Antioksidan — 97
 - A. Aktivitas Antioksidan Nanopartikel dari Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang Berasal dari Indonesia dan Thailand — 98
 - B. Formulasi dan Fortifikasi Yoghurt dengan Ekstrak Buah Lakum [*Cayratia trifolia* (L.) Domin] sebagai Antioksidan — 103
 - C. Efek Antioksidan Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar*) terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Hyperlipidemia — 106

- D. Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.)
Meningkatkan Aktivitas Antioksidan Endogen pada
Tikus Hiperlipidemik — 109

Bab 6 Efek Stress Oksidatif pada Patogenesis Penyakit Diabetes Mellitus — 113

- A. Diabetes Mellitus — 113
- B. ROS (Reactive Oxygen Species) — 114
- C. Stres Oksidatif — 114
- D. Stres Oksidatif dan Patogenesis Diabetes Mellitus —
115
- E. Stres Oksidatif dan Resistensi Insulin — 116
- F. Penelitian *in Vivo* — 119
- G. Bahan-bahan Alam yang Mempunyai Aktivitas
Hipoglikemik dan Mencegah Terjadinya Stres
Oksidatif — 121
 - 1. Sambiloto (*Andrographis paniculata*) — 121
 - 2. Kayu Manis (*Cinamomum burmanii*) — 122

Bab 7 Stres Oksidatif dan Demensia — 123

- A. Radikal Bebas — 123
- B. Peroksidasi Lipid — 124
- C. Stres Oksidatif — 126
- D. Antioksidan — 128
- E. Trimetilin sebagai Induktor Stres Oksidatif Penyakit
Neurogeneratif — 129

Daftar Pustaka — 141

Glosarium — 177

Tentang Penulis — 179

Daftar Tabel

- Tabel 1. Klasifikasi prooksidan dan mekanisme umumnya membentuk stres oksidatif —36
- Tabel 2. Klasifikasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) —42
- Tabel 3. Protokol analisis aktivitas antioksidan pada metode pengujian berbasis HAT dan ET —71
- Tabel 4. Penentuan Kadar Flavonoid Total Kelopak Bunga Rosella —99
- Tabel 5. Stabilitas Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Buah Lakum dan Fortifikasi Yoghurt Ekstrak Buah Lakum —104
- Tabel 6. Hasil Evaluasi Fortifikasi Yoghurt Ekstrak Lakum —105
- Tabel 7. Kandungan Kurkumin pada Ekstrak *Z. cassumunar* —108

Daftar Gambar

- Gambar 1. Reduksi Fe^{3+} - TPTZ menjadi Fe^{2+} - TPTZ —63
- Gambar 2. Reaksi yang Terlibat dalam Uji TBARS dan Uji Peroksidasi Lipid —91
- Gambar 3. Reaksi Antara Asam Tiobarbiturat dengan MDA —93
- Gambar 4. Kurva Standar MDA —101
- Gambar 5. Uji Aktivitas Antioksidan —102
- Gambar 6. Efek Antioksidan Ekstrak Rimpang *Z. cassumunar* terhadap Aktivitas SOD Hati Tikus —108
- Gambar 7. Desain Induksi dan Perawatan HFD —110
- Gambar 8. Pembagian Kelompok Perlakuan Hewan —111
- Gambar 9. Kromatogram HPLC Ekstrak Daun Ubi Jalar Dibandingkan dengan Rutin dan Quercetin —111
- Gambar 10. Generasi ROS yang Diinduksi Hiperglikemia dan Akibat Aktivasi Jalur Patologis —115
- Gambar 11. Pengaruh ROS terhadap Jalur Pensinyalan Insulin —117
- Gambar 12. Peran Aktivasi Serin Kinase dalam Resistensi Insulin Akibat Stres Oksidatif —118
- Gambar 13. Pembentukan ROS Melalui Siklus Redoks Aloksan —120

- Gambar 14. Proses Peroksidasi Lipid —126
- Gambar 15. Rumus Bangun Trimetiltin Klorida —130
- Gambar 16. Peroksidasi Lipid —133
- Gambar 17. Mekanisme Pertahanan Antioksidan —135
- Gambar 18. Mekanisme Ketoksikan TMT —136

Bab 1

Antioksidan

*A*ntioksidan merupakan senyawa dengan struktur molekul yang dapat mendonorkan elektronnya secara cuma-cuma kepada molekul radikal bebas sehingga memutus reaksi berantai dari radikal bebas tersebut. Antioksidan adalah senyawa penghambat atau inhibitor yang menangkalkan reaksi antara radikal bebas dengan target molekulnya.

Radikal bebas dikenal sebagai molekul yang sifatnya tidak stabil terlebih sangat reaktif. Mengapa sangat reaktif dan ada reaksi yang begitu kuat? Hal ini dikarenakan adanya elektron-elektron yang tidak memiliki pasangan, dan berupaya mencoba mencari elektron lain untuk menstabilkan dirinya.

Antioksidan ada yang diproduksi atau terjadi secara alami dalam tubuh (antioksidan endogen) dan ada juga yang berasal dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Antioksidan alami yang ada dalam tubuh (endogen) antara lain: enzim seperti superoksida dismutase, glutathione peroksidase, dan katalase. Antioksidan dari luar tubuh/antioksidan eksogen, dapat berupa vitamin dan mineral (makanan atau suplemen yang dikonsumsi). Vitamin dan mineral yang dikenal mempunyai aktivitas antioksidan antara lain: betakaroten, senyawa flavonoid, vitamin C, selenium, mangan, vitamin E, dan zinc.

Antioksidan endogen bekerja secara sinergis dengan antioksidan eksogen dalam proses menetralkan radikal bebas. Misalnya, pada proses radikal bebas yang ditangkap oleh vitamin E, maka vitamin E berubah sifatnya menjadi radikal. Lalu vitamin E radikal ini mendapat elektron dari vitamin C yang kemudian berubah menjadi vitamin C radikal, yang pada akhirnya akan dinetralkan oleh glutathione. Jadi, dari proses ini kemudian disimpulkan bahwa tidak ada yang bersifat merusak (destruktif).

Jumlah radikal bebas yang tinggi dalam tubuh dan tidak seimbang dengan jumlah antioksidan akan menimbulkan banyak kerusakan. Tubuh membutuhkan antioksidan tambahan dalam situasi tertentu, yaitu di saat jumlah radikal bebas tinggi, seperti saat berolahraga berat, infeksi berat, merokok atau menghirup asap rokok secara pasif, serta paparan polusi udara dan sinar UV secara terus menerus.

Di balik kerugian atau ancaman terlalu banyaknya radikal bebas di dalam tubuh dan tidak diimbangi dengan keberadaan antioksidan yang cukup, radikal bebas tetap dibutuhkan karena berperan dalam memicu pembentukan sel baru. Namun, apabila jumlah radikal bebas dan antioksidan tidak seimbang, maka akan memicu terjadinya stres oksidatif dalam tubuh, kemudian menyebabkan kerusakan organ yang mengarah pada timbulnya berbagai penyakit. Terdapat faktor-faktor yang dapat meningkatkan kebutuhan antioksidan seperti ketika sedang sakit, infeksi, dan saat pemulihan setelah sakit, serta ketika kondisi stres baik stres fisik maupun emosional.

Antioksidan mampu melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas yang terkait dengan penyakit. Antioksidan kini banyak digunakan dalam suplemen untuk membantu stamina tubuh dan pencegahan penyakit seperti kanker dan jantung koroner, serta penyakit degeneratif lainnya (Parwata, 2016: 1-54).

Antioksidan alami yang berasal dari buah dan sayur maupun dalam bentuk suplemen antioksidan, memiliki manfaat untuk

meningkatkan kadar antioksidan di dalam tubuh, meningkatkan, respons imun tubuh kita, untuk melawan berbagai mikroorganisme dan virus penyebab penyakit, serta menyehatkan kulit, mencegah penuaan dini, mencerahkan kulit mengurangi iritasi, menyamarkan kerutan halus pada wajah dengan menetralkan radikal bebas. Antioksidan sangat berperan untuk mencegah timbulnya stres oksidatif.

A. Jenis-jenis Antioksidan

Menurut Berawi (2018, 412-417), antioksidan sangat berperan dalam mencegah stres oksidatif yang dapat dialami oleh tubuh. Senyawa antioksidan adalah senyawa pendonor elektron yang mengurangi tingkat atau jumlah radikal bebas dan mengurangi efek stres oksidatif yang dipicu oleh radikal bebas. Badriyah dan Manggara (2015: 26-28) juga mengatakan bahwa antioksidan juga bermanfaat dalam mencegah terjadinya *aging* atau penuaan serta munculnya penyakit degeneratif. Radikal bebas yang berada di udara, cemaran makanan, sinar matahari, bahkan dalam proses metabolisme tubuh, dapat dilawan dengan antioksidan agar tidak timbul stres oksidatif. Tubuh manusia memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dalam jumlah yang tidak berlebihan. Antioksidan sangat berperan dalam menangkalkan terjadinya radikal bebas dan mencegah kerusakan sel dan membran sel.

Antioksidan akan mudah dioksidasi oleh radikal bebas serta menangkalkan molekul lain yang dioksidasi oleh radikal bebas serta oksigen reaktif penyebab kerusakan yang terdapat di dalam sel. Antioksidan mampu menangkalkan radikal bebas dalam tubuh dan memutus reaksi berantai yang diakibatkannya. Radikal bebas merupakan molekul yang tidak stabil dan bisa membuat rusaknya sel-sel dalam tubuh.

Antioksidan endogen yang paling terkenal adalah glutathione, yang dihasilkan oleh hati. Glutathione berperan penting dalam menangkalkan radikal bebas serta mencegah terjadinya kerusakan sel. Selain itu,

tubuh juga menghasilkan enzim seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase, yang berfungsi untuk mengurai radikal oksigen serta mencegah terjadinya kerusakan sel.

Vitamin-vitamin seperti vitamin E dan C juga merupakan antioksidan endogen yang penting. Vitamin C dihasilkan oleh tubuh dari glukosa dan dapat melawan radikal bebas akibat dari adanya radikal oksigen. Vitamin E juga termasuk antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas secara kuat yang disebabkan oleh radikal oksigen dan lemak.

Antioksidan endogen memainkan peran penting dalam pertahanan tubuh terhadap penyakit dan kerusakan sel. Namun, kadar antioksidan endogen dapat berkurang seiring dengan bertambahnya usia atau akibat faktor-faktor seperti polusi, paparan sinar matahari, dan pola hidup yang tidak sehat. Maka dari itu, betapa pentingnya kita untuk memelihara kesehatan tubuh dengan cara mengonsumsi makanan yang banyak mengandung antioksidan serta menjalani pola hidup sehat agar kadar antioksidan endogen dapat terjaga dengan baik.

Antioksidan dapat dibedakan menjadi beberapa jenis berdasarkan cara kerja, asal, dan sumbernya. Berikut adalah penjelasan dari masing-masing jenis antioksidan tersebut:

1. Berdasarkan Cara Kerja

Tidak semua jenis antioksidan memiliki fungsi yang sama. Jenis-jenis antioksidan tersebut memiliki cara kerja dan tugas untuk melindungi organ yang berbeda. Menurut cara kerjanya dalam menangkal atau mencegah radikal bebas, ada 3 jenis antioksidan. Ketiga antioksidan tersebut ialah:

a. Antioksidan Primer

Merupakan antioksidan yang dapat menghambat terbentuknya radikal bebas (propagasi) baru dengan memutus tali berantai dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil.

Contoh antioksidan primer ialah superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GPx) (Berawi, 2018: 412-417). Penjelasan lebih detail dan rinci mengenai contoh antioksidan ini akan dibahas dalam sub bab selanjutnya.

b. Antioksidan Sekunder

Diartikan sebagai antioksidan yang mampu menghambat terjadinya reaksi berantai karena mampu menangkap senyawa radikal bebas. Beberapa contoh antioksidan tersebut ialah betakaroten, vitamin E, dan vitamin C. Vitamin C dapat mencegah dan memperbaiki kerusakan sel serta merangsang pembentukan kolagen. Vitamin E, dapat mengurangi peradangan dan meningkatkan imunitas tubuh.

c. Antioksidan Tersier

Dikenal pula sebagai *repair enzyme* karena kemampuannya dalam membenahi kerusakan sel serta jaringan karena keberadaan radikal bebas dalam tubuh. Contoh antioksidan tersebut adalah metionin sulfosida reduktase, *DNA repair enzyme*, protease, transferase dan lipase merupakan beberapa contoh antioksidan tersier sebagai *repair enzyme* yang telah ditemukan selama ini.

Tidak semua antioksidan bisa bekerja sendirian. Misalnya, vitamin C dan E yang harus bekerja bersama-sama dan sinergi itu disebut dengan *antioxidant defence network* atau pertahanan jaringan antioksidan. Oleh karena itu, lebih bervariasinya sumber antioksidan yang kita konsumsi, akan semakin maksimal senyawa antioksidan tersebut memberikan efek atau manfaat bagi tubuh. Dengan beberapa mekanisme kerja tersebut, manfaat antioksidan yang dapat dirasakan adalah dapat mencegah timbulnya penyakit degeneratif, mencegah terjadinya *aging*, memperkuat sistem imun, melindungi sistem saraf dan membuat mata lebih sehat.

2. Berdasarkan Sumbernya

Berdasarkan sumbernya, terdapat 2 kelompok antioksidan, yaitu:

a. Antioksidan Eksogen

Bersumber dari asupan yang diperoleh dari luar tubuh. Antioksidan eksogen dapat membantu mengembalikan keseimbangan dalam pertahanan terhadap oksidan. Antioksidan eksogen bersumber dari buah-buahan dan sayur berwarna yang banyak mengandung karotenoid dan antosianin, rempah-rempah seperti jahe, temulawak, dan kunyit mengandung banyak zat aktif seperti kurkumin, zingiberene, dll. Antioksidan eksogen telah menjadi perhatian utama untuk mengembangkan metode pencegahan terjadinya aterosklerosis dengan cara menghambat peroksidasi lipid dalam LDL (Manev & Kharlamov, 1996: 1546–1551).

Salah satu contoh sumber antioksidan eksogen terdapat pada tumbuhan *Rosella sabdariffa* L. yang dari penelitian penulis diketahui dapat memberikan efek hepatoprotektif terhadap toksisitas dari parasetamol, karbon tetraklorida, dan streptozotocin. Juga telah dilaporkan bahwa perlakuan ekstrak rosella dapat menurunkan SGPT, SGOT, dan ALP setelah paparan DMBA (Nurkhasanah, dkk., 2017: 2411–2416).

b. Antioksidan Endogen

Merupakan antioksidan yang sudah ada dan diproduksi di dalam tubuh manusia. Antioksidan tersebut meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), dan katalase (CAT) serta nonenzim yang merupakan senyawa kecil glutathion (Parwata, 2016: 1–54). Beberapa penelitian menyebutkan, bahwa enzim ini meningkat aktivitasnya seiring dengan terjadinya peningkatan oksigen reaktif, sebagai upaya untuk menangkal efek radikal bebas yang ditimbulkan. Berikut adalah penjelasan dari masing-masing antioksidan endogen/enzim antioksidan tersebut:

1) Superoksida dismutase (SOD)

Menurut Halliwell (2016), SOD terdapat pada sitosol dan mitokondria. Superoksida dismutase (SOD) merupakan metaloenzim yang terdapat di dalam tubuh karena alasan keaktifannya tergantung pada kofaktor logam Cu, Zn, Fe, dan Mn. Maka dari itu, SOD dikelompokkan menjadi Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, dan Mn-SOD. Cu/Zn SOD dalam sel dijumpai di sitosol, ekstraseluler, dan kloroplas tumbuhan tingkat tinggi. Fe-SOD dijumpai dapat berikatan dengan kloroplas, dan Mn-SOD dijumpai di mitokondria sel eukariot dan peroksisom.

Masing-masing kelompok SOD tersebut, respons stres oksidatifnya memengaruhi derajat aktivitas pada bagian subseluler di mana SOD tersebut berada. Banyaknya produk peroksidasi lipid dari setiap organel sel menjadi parameter yang merepresentasikan aktivitas kerja enzim SOD. Sehingga rendahnya produksi oksidasi lipid menjadi indikator tingginya aktivitas SOD (Parwata, 2016: 1–54).

Radikal superoksida yang dihasilkan dari proses respirasi maupun lingkungan, diubah oleh enzim superoksida dismutase (SOD) membentuk hidrogen peroksida (H_2O_2) yang sifatnya masih reaktif. Keberadaan superoksida dismutase di dalam sel, ada pada sitosol serta mitokondria (Badriyah dan Manggara, 2015: 26-28).

2) Glutation peroksidase (GPx)

Merupakan selanoprotein dan memiliki 4 sub unit protein yang tugasnya mengkatalisis reaksi reduksi H_2O_2 membentuk ROOH (senyawa organik hidroperoksida). Keberadaan enzim GPx banyak dijumpai di sitosol hepar/hati. Glutation atau γ -glutamylcysteinylglycine (GSH) adalah antioksidan sulfhydryl (SH), antitoksin dan kofaktor enzim. GSH ada pada hewan, tumbuhan/tanaman, bahkan mikroorganisme. Antioksidan ini larut dalam air

dan terkandung pada sitosol sel atau substrat larut dalam air lainnya. Glutation peroksidase (GPx) disebut sebagai antioksidan dalam sel yang mayor karena jumlahnya yang cukup besar.

Glutation yang berada di sel dikenal sebagai GSH apabila dalam bentuk antioksidan tereduksi dan dikenal sebagai GSSG (glutation disulfide) apabila dalam bentuk teroksidasi. Parameter yang peka atau perseptif bagi stres oksidasi ialah rasio (perbandingan) antara GSH dengan GSSG. GSH dan GPx (enzim glutation peroksidase) dapat mengkatalisis proses reduksi hidroperoksidase lemak menjadi alkohol serta hidrogen peroksida menjadi air.

3) Katalase (CAT)

Katalase (CAT) merupakan enzim yang memiliki gugus forfirin dan memiliki disusun lebih dari 500 asam amino. Dalam proses katalis reaksi reduksi senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi bentuk oksigen (O_2) serta air (H_2O) merupakan salah satu tugas dari enzim CAT ini. Diketahui pada pH 7, aktivitas katalase dapat bertambah aktif sejalan dengan meningkatnya akumulasi H_2O_2 , maka pada pH ini dinyatakan sebagai aktivitas katalase yang optimal. Pada beberapa organ seperti hepar/hati, renal/ginjal, otak, dan pulmo, jaringan lemak, dan glandula (kelenjar) adrenal (kelenjar yang terletak di bagian atas ren/ginjal) ditemukan enzim katalase dengan konsentrasi tinggi.

Katalase mengkatalisis penguraian H_2O_2 menjadi O_2 dan H_2O . Enzim katalase ialah enzim yang sangat penting dalam memproteksi sel dari kerusakan oksidatif oleh spesies oksigen reaktif (Nurkhasanah, dkk., 2018: 851–856). Katalase ialah satu diantara enzim antioksidan yang banyak ditemukan di organ hati. Maka dari itu penurunan aktivitas enzim katalase dapat dijadikan indikator sensitif untuk menunjukkan adanya kerusakan hati.

3. Berdasarkan Asalnya

a. Antioksidan Sintetis

Jenis antioksidan ini sering dimanfaatkan untuk pengolahan produk pangan. Antioksidan sintetis tersebut semisal Butil Hidroksi Toluen (BHT), Butil Hidroksi Anisol (BHA), propil galat dan Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ). Antioksidan sintetis diperuntukkan sebagai bahan tambahan (zat aditif) untuk mencegah oksidasi produk pangan, sehingga bisa menambah umur simpan pada berbagai produk makanan dan minuman. Kandungan lemak dalam makanan adalah komponen yang sangat mudah teroksidasi. Oksidasi lemak dalam makanan mengakibatkan terjadinya ketengikan. Namun demikian, penggunaan antioksidan sintetis dalam waktu yang cukup lama dapat menimbulkan efek samping dan risiko karsinogenesis dan dapat menyebabkan peradangan hingga kerusakan hati (Amarowicz & Naczki, 2012: 957–961).

Berikut adalah beberapa jenis antioksidan sintetis tersebut:

1) Butil Hidroksi Anisol (BHA)

Butil Hidroksi Anisol (BHA) mulai digunakan sebagai zat aditif dalam produk makanan pada tahun 1947. Pada saat itu Butil Hidroksi Anisol (BHA) digunakan dalam produk makanan berminyak untuk mencegah makanan supaya tidak mudah basi. Bagian Butil Hidroksi (BHA) memiliki manfaat sebagai antioksidan adalah bagian cincin aromatis terkonjugasi yang mampu bertindak sebagai stabilisator bagi radikal bebas, sehingga tidak terjadi reaksi radikal bebas lagi. Aktivitas antioksidan yang dimiliki Butil Hidroksi Anisol (BHA) lebih tinggi dibanding vitamin E (α -tokoferol) (Han, dkk., 2004). Butil Hidroksi Anisol (BHA) dapat menyebabkan gangguan metabolisme pada manusia. Dalam penelitian, Butil Hidroksi Anisol (BHA) terbukti dapat menyebabkan pembesaran hati dan proliferasi retikulum.

Menurut Institut Kesehatan Nasional Amerika Serikat (National Institute of Health), penggunaan Butil Hidroksi Anisol (BHA) yang digunakan sebagai zat aditif pada makanan dapat menjadi senyawa yang bersifat karsinogenik dan dengan pengujian melalui hewan coba efek karsinogeniknya akan terlihat. Pada sebuah penelitian *in vivo* dengan hewan coba berupa tikus, Butil Hidroksi Anisol (BHA) dosis tinggi yang terkandung di makanan dapat menimbulkan papilloma serta *squamous cell carcinoma* (Nyoman, 2014).

2) Butil Hidroksi Toluen (BHT)

Merupakan zat kimia berupa molekul bioaktif lipofilik dan turunan fenol yang digunakan sebagai antioksidan sintetis di dalam makanan kemasan (Aprilia, dkk., 2018: 1154–1165). Beberapa penelitian menyebutkan bahwa BHT (Butil Hidroksi Toluen) dengan dosis yang tinggi dapat menyebabkan neurotoksisitas akut, toksisitas hepar/hati, ginjal, dan paru. BHT (Butil Hidroksi Toluen) adalah organik bioaktif lipofilik yang pada umumnya banyak digunakan sebagai bahan dalam berbagai bahan makanan untuk memperlambat proses kerusakan lemak dan sebagai zat aditif di banyak produk farmasi. BHT (Butil Hidroksi Toluen) merupakan turunan dari fenol (Panicker, Sisilamma, & Krishna, 2014: 758-763).

Terdapat 2 metabolisme utama BHT (Butil Hidroksi Toluen), yaitu melalui oksidasi dan konjugasi dari BHT *alkyl substituent* dan melalui *phenoxy radical*. Di dalam tubuh, BHT (Butil Hidroksi Toluen) dimetabolisme di dalam hepar/hati menjadi sulfat dan asam glukonarat yang diekskresikan melalui urin. Derivat ini akan disekresikan ke dalam tubulus kontortus proksimal dalam nefron melalui sistem yang bertanggung jawab untuk transport anion. Peningkatan derivat BHT (Butil Hidroksi Toluen) di unit

fungsional ginjal terjadi akibat akumulasi aktif melalui darah ke dalam tubulus dan reabsorpsi air sepanjang nefron.

3) Propil Galat

Merupakan senyawa kimia ester yang dibentuk dari kondensasi asam galat dan propanol. Seperti halnya BHA dan BHT, propil galat ialah satu dari jenis antioksidan sintetis yang dapat difungsikan sebagai zat aditif pada makanan, terutama ada di makanan yang banyak mengandung minyak serta lemak. Propil galat dapat menangkalkan adanya oksidasi pada makanan dalam waktu yang cepat. Dengan tambahan propil galat pada makanan, makanan akan cenderung awet atau tahan lama dan rasanya tetap enak.

4) Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ)

Termasuk antioksidan sintetis yang biasa dimanfaatkan sebagai bahan tambahan pangan, digunakan dengan tujuan menjaga makanan agar tetap awet, tahan lama, tidak mudah basi atau tengik.

Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika atau FDA (*Food and Drugs Administration*) menyepakati dan mengizinkan penggunaan Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) dengan batas penambahan 0,02% dari total keseluruhan penggunaan minyak. Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) terbukti paling efektif dibanding dengan antioksidan sintetis lain untuk lemak serta minyak, spesifiknya minyak nabati dan digunakan secara luas karena relatif murah. Pada umumnya TBHQ berupa bubuk berwarna putih hingga coklat terang. TBHQ memiliki kelarutan yang cukup pada lemak serta minyak, maka sebab itu TBHQ sangat potensial sebagai alternatif antioksidan yang dapat dimanfaatkan dalam mempertahankan minyak goreng kelapa sawit sebagai bahan utama untuk menggoreng. Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ) mempunyai rumus molekul $(\text{CH}_3)_3\text{CC}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$.

TBHQ juga dikenal sebagai tert-butyl-1,4-benzenediol atau *2-tertbutylhydroquinone*.

b. Antioksidan Alami

Antioksidan ini dapat diperoleh dari berbagai bagian tumbuhan seperti daun, batang, akar, kayu, buah, biji, bunga, bahkan kulit kayu serta serbuk sari. Bagian tumbuhan dikatakan sebagai sumber antioksidan alami karena merupakan bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan. Vitamin A, vitamin C, vitamin E, karotenoid, senyawa fenolik, dan polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat (semisal asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain), tokoferol, kuomarin, serta asam-asam organik polifungsional merupakan senyawa-senyawa antioksidan alami yang selama ini lazim dikenal. Sementara flavon, isoflavon, flavonol, katekin, dan kalkon merupakan contoh dari golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan. Flavonoid sendiri berfungsi untuk membersihkan radikal bebas dari tubuh, menyokong kerja sel-sel tubuh, serta meminimalkan efek zat beracun pada tubuh. Ekstrak tanaman banyak dimanfaatkan karena diketahui mampu menghambat serta menetralkan reaksi oksidasi yang menyertakan radikal bebas, baik yang endogen maupun eksogen karena memiliki kandungan senyawa antioksidan. Mikronutrien yang terkandung dalam tumbuhan seperti asam folat, karotenoid, antosianin, vitamin A, C, E, dan polifenol berkemampuan menangkal radikal bebas atau oksidan, yang oleh sebab itu dapat dijadikan sebagai pengganti penggunaan antioksidan sintetis. Kini, penelitian untuk mencari lebih banyak sumber antioksidan alami sedang meningkat. Terbukti dengan bertambah banyaknya riset tentang berbagai macam bagian jenis tumbuhan yang mengandung antioksidan untuk menangkal dan bahkan menghentikan radikal bebas (Mendoza Prez & Alejandro, 2013).

Antioksidan alami yang diperoleh dari tumbuhan tingkat tinggi adalah sumber agen terapeutik yang penting. Oleh karena itu banyak kelompok penelitian saat ini sedang mencari tahu aktivitas biologis antioksidan dari tanaman yang berbeda atau bermacam variasi (Mendoza Prez & Alejandro, 2013). Kadar antioksidan juga dapat ditingkatkan dari sumber alaminya, misalnya dengan membuat formulasi baru seperti yogurt untuk menambah nilai fortifikasi gizi dan kandungan antioksidan. Pada penelitian penulis (Nurkhasanah & Kumalasari, 2018: 91), ekstrak buah lakum (*Cayratia trifolia* L.) yang mengandung banyak antosianin diformulasikan menjadi yogurt karena antosianin pada buah lakum memiliki kestabilan yang tinggi jika disimpan pada kondisi asam, suhu rendah, dan tanpa cahaya. Sehingga, dengan membuat formulasi yoghurt ini, dapat menambah manfaat fungsional yoghurt sebagai produk antioksidan karena kandungan senyawa antosianinnya.

Selain buah lakum (*Cayratia trifolia* L.), tanaman yang mengandung antosianin dan berpotensi untuk dijadikan yoghurt fortifikasi ialah tanaman rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). Pada penelitian (Nurkhasanah & Novitasari, 2019: 141–146) menyebutkan bahwa fortifikasi yoghurt dengan ekstrak rosella dapat meningkatkan aktivitas imunomodulator karena terkandung senyawa antosianin di dalamnya. Pengaruh aktivitas imunomodulator yogurt yang difortifikasi ekstrak rosella tersebut diketahui dari peningkatan sekresi *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) dan *Nitric Oxide* (NO).

Penelitian lain yang dilakukan penulis terkait formulasi yoghurt sebagai antioksidan, bersumber dari ekstrak buah jambang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) yang juga mengandung banyak antosianin. Buah jambang dengan kandungan antosianin merupakan satu di antara sumber antioksidan eksogen alami.

Dalam kajian praklinis menjelaskan bahwa terdapat aktivitas antioksidan dan berpotensi sebagai obat cacing, anti kanker, anti inflamasi, anti bakteri, dan anti diabetes pada buah jamblang yang terkandung di bagian buah, daun, dan batangnya. Terkandung komponen zat aktif antosianin pada pigmen dari ekstrak buah jamblang. Maka tingginya kadar ekstrak buah jamblang sejalan dengan meningkatnya kadar antosianin (Yanuarto & Nurkhasanah, 2019: 114–127).

Stres oksidatif juga dapat dicegah dengan antioksidan alami yang berasal dari rempah. Rempah dan herbal mengandung pengikat radikal bebas seperti polifenol, flavonoid dan senyawa fenolik, dan semua ini memiliki aktivitas antioksidan. Studi farmakologi yang lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi konstituen aktif ekstrak tumbuhan yang bertanggung jawab atas aktivitas antioksidan. Senyawa dalam tanaman sangat penting untuk pengobatan beberapa penyakit kronis dan degeneratif seperti diabetes, kanker, dan lainnya (Mendoza Prez & Alejandro, 2013). Antioksidan alami didapatkan dari bahan alam. Semua macam antioksidan alami sangat gampang diabsorpsi oleh usus yang kemudian didistribusikan ke seluruh tubuh (Parwata, 2016: 1-54).

Antioksidan, seperti yang diuraikan di atas, dapat dikelompokkan menjadi enzim dan vitamin. Antioksidan yang berupa enzim dan diproduksi oleh tubuh antara lain adalah superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase (GPx), serta katalase (CAT). Sedangkan antioksidan yang berwujud vitamin antara lain adalah betakaroten (vitamin A), α -tokoferol (vitamin E) dan asam askorbat (vitamin C) (Parwata, 2016: 1-54). Kemudian sumber antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan di antaranya ialah senyawa polifenol atau fenolik, golongan flavonoid, turunan asam sinamat, tokoferol, kumarin, dan asam organik

(Idris, 2011: 53). Derajat toksisitas yang rendah menjadi alasan mengapa antioksidan alami lebih banyak dimanfaatkan apabila dibandingkan dengan antioksidan sintetis.

Beberapa penjelasan lebih lanjut mengenai macam-macam antioksidan alami tersebut:

1) Betakaroten (Vitamin A)

Peran karoten di antaranya sebagai antioksidan dan bermanfaat memproteksi atau melindungi tubuh (Parwata, 2016: 1-54). Dalam membantu pertumbuhan, memelihara kesehatan mata, kulit, dan selaput lendir serta melindungi terjadinya infeksi (Idris, 2011: 53). Karotenoid yang banyak ditemukan dalam buah dan sayuran berwarna juga disebut sebagai provitamin A. Kandungan tersebut dapat mudah dijumpai pada buah dan sayuran yang warnanya cenderung kuning, *orange*, dan merah (Idris, 2011: 53).

Betakaroten adalah senyawa organik yang termasuk dalam terpenoid memiliki warna oranye-merah dan melimpah pada tumbuhan dan buah-buahan. Betakaroten telah dilaporkan memiliki banyak manfaat yang tidak ditemukan pada senyawa lain. Tubuh manusia hanya membutuhkannya dalam beberapa milligram per hari, tetapi jika tidak terpenuhi dapat mengakibatkan gangguan fungsi (Idris, 2011: 53). Manfaat betakaroten bagi tubuh antara lain dapat mencegah dan mengurangi risiko kanker. Mengonsumsi makanan atau buah-buahan yang mengandung betakaroten diharapkan dapat menunjang kebutuhan gizi dan meningkatkan kekebalan tubuh.

Karoten juga memiliki peran dalam pencegahan penyakit jantung sistemik. Kadar antioksidan dalam plasma yang rendah dikaitkan dengan meningkatnya risiko penyakit jantung koroner. Oksidasi LDL (*Low Density Lipoprotein*) dapat menjadi awal terjadinya aterosklerosis. Vitamin A merupakan senyawa karotenoid yang

melindungi sel-sel tubuh dari radikal bebas yang penting untuk menjaga epidermis kulit agar tetap sehat. Kadar karotenoid yang tinggi juga dapat meningkatkan kekebalan tubuh. Beberapa contoh yang mengandung betakaroten antara lain adalah melon, pisang, semangka, ceri, tomat, wortel, labu, dan sebagainya (Idris, 2011: 53).

Betakaroten berkemampuan dalam melindungi sel normal maupun sel yang telah mengalami perubahan (sel mutan) yang bisa memicu pertumbuhan kanker. Mekanismenya dimulai dengan menekan ekspresi gen yang menjadi memicu terjadinya tumor. Beta-karoten merupakan komponen penting dari detoksifikasi radikal bebas (Idris, 2011: 53). Karotenoid mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker tertentu yang menghambat perkembangan kanker melanoma, paru-paru, prostat, payudara, dan leukemia. Beta-karoten menghambat mutase sel normal menjadi sel ganas dengan menghambat proliferasi sel dan meningkatkan kejadian apoptosis.

Beta-karoten bertindak sebagai prekursor vitamin A, dan potensinya dalam menjaga kesehatan mata dan integritas membrane sel membuat senyawa ini sangat penting bagi tubuh. Banyak karotenoid bertindak sebagai prekursor retinoid, termasuk retinol, yang menghambat serangan oksidatif melalui potensinya sebagai penyerap oksidasi singlet (Idris, 2011: 53). Berdasarkan penelitian Idris (2011: 53), kadar betakaroten dari buah melon yang cukup tinggi, dapat digunakan sebagai obat antikanker, melindungi epidermis kulit agar tetap sehat, serta dapat meningkatkan kekebalan tubuh.

2) Asam askorbat (vitamin C)

Vitamin C merupakan antioksidan yang dapat larut dalam air. Asam askorbat dapat menangkap oksigen singlet kemudian

bereaksi secara cepat dengan radikal hidroksil dan mengubahnya menjadi hidrogen peroksida (Paramita, dkk., 2019: 1-7). Vitamin C adalah satu vitamin yang dibutuhkan untuk membantu metabolisme tubuh. Asam askorbat (vitamin C) berperan dalam sintesis kolagen antar sel (Badriyah dan Manggara, 2015: 26-28). Asam askorbat memiliki sifat mudah teroksidasi. Oksidasi vitamin C dapat dipercepat dengan panas, cahaya, alkali, enzim, dan katalis logam seperti tembaga dan besi. Asam askorbat bersifat mudah rusak oleh panas (termolabile) (Orobiyi, dkk., 2015).

Asam askorbat mempunyai gugus kromofor yang begitu peka terhadap rangsangan cahaya. Asam askorbat (vitamin C) termasuk dalam bahan farmasi yang banyak digunakan sebagai antioksidan dalam sediaan farmasi. Kadar asam askorbat dalam sediaan farmasi dapat ditentukan konsentrasinya secara titrasi iodometri atau memakai spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 265 nm. Asam askorbat (vitamin C) memberikan proteksi terhadap radikal bebas sebagai antioksidan dan diperlukan untuk meningkatkan kekebalan tubuh, mencegah replikasi virus dan produksi interferon (Rindler dkk., 2013: 1979–1990). Asam askorbat (vitamin C) diketahui dapat mencegah dan menyembuhkan flu, mengurangi angka kejadian kelahiran premature dan pre-eklampsia, menurunkan risiko kanker dan penyakit jantung, serta dapat meningkatkan kualitas hidup dengan mencegah demensia (Han, dkk., 2021: 1–18).

Vitamin C disebut sebagai asam askorbat karena mengacu pada sekelompok analog asam askorbat yang dapat bersifat sebagai molekul sintetik maupun molekul alami. Asam askorbat (vitamin C) adalah keto lakton yang memiliki dua gugus hidroksi. Vitamin C dapat terionisasi dan larut dalam air (Buckner, dkk., 2018: e275-e281). Vitamin C merupakan reduktor yang kuat dan dapat kehilangan elektron pada 2 tahap, yaitu tahap pembentukan

radikal askorbat dan dilanjutkan asam dehidroaskorbat. Radikal bebas asam askorbat relatif stabil karena elektron yang tidak berpasangan terdelokalisasi oleh resonansi. Konsentrasi asam askorbat dalam plasma manusia sehat adalah sekitar 10 g/mL. Pada konsentrasi ini, askorbat adalah *co-antioxidant* dengan vitamin E untuk melindungi LDL (*Low Density Lipoprotein*) dari radikal peroksil (Gusti, dkk., 2021). Radikal askorbat cukup tidak reaktif dan dapat direduksi menjadi askorba oleh NADH yang bergantung pada reduktase dan NADPH (Linster, 2007: 1–22). Radikal askorbat secara alternatif dapat mengalami disproporsionasi reaksi yang bergantung pada pH dan menghasilkan pembentukan askorbat dan asam dehidroaskorbat (Corti & Casini, 2010: 107–115).

Asam askorbat (vitamin C) secara kimia dapat bereaksi dengan sebagian besar ROS fisiologis penting dan bertindak sebagai antioksidan yang larut dalam air. Mekanisme reaksi antioksidan dari vitamin C didasarkan pada HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) untuk radikal peroksil, inaktivasi oksigen singlet, dan penghapusan molekul oksigen. HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) adalah metode yang dipakai dalam mengukur kemampuan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom H. Metode berlaku juga untuk golongan fenolik. Dalam pengujian, biasanya menggunakan senyawa radikal bebas yang berwarna. Perubahan warna senyawa dapat digunakan sebagai tanda adanya aktivitas antioksidan, yaitu dari yang berwarna menjadi tidak berwarna (Buettner, 1996). Selain itu, juga telah terbukti bahwa askorbat dapat menghasilkan reaksi dengan agen pengoksidasi melalui SET (*Single Electron Transfer*), yaitu metode yang dasarnya adalah reaksi redoks.

3) α -tokoferol (vitamin E)

Vitamin E adalah antioksidan utama dan bersifat larut lemak dan dapat larut membran (Barkas, dkk., 2020: 1–22). α -tokoferol

(vitamin E) memiliki peran penting dalam menghambat peningkatan produksi sitokin seperti interleukin-6 (IL-6) atau *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) yang termasuk sitokin proinflamasi yang berperan dalam proses peradangan. Penggunaan vitamin E pada produk-produk kosmetika sangat populer, karena sifat antioksidannya yang kuat. Konsumsi vitamin E dalam kadar yang memadai dapat mencegah timbulnya berbagai penyakit seperti aterosklerosis, kanker, dan katarak, serta dapat mencegah proses aging (penuaan) (Parwata, 2016: 1-54). Sifat antioksidan vitamin E sangat penting untuk melindungi dan mencegah sel serta organ tubuh dari kerusakan sehingga dapat memperlambat terjadinya penuaan. Vitamin E ini digolongkan pada kelompok vitamin meskipun sebenarnya tidak berfungsi sebagai kofaktor reaksi enzimatik seperti halnya vitamin-vitamin yang lain.

Vitamin E tidak dapat disintesis oleh tubuh manusia dan harus didapatkan dari makanan dan suplemen. Selain dari α -tokoferol, tokotrinol adalah nama lain dari vitamin E. Di antara nama-nama yang lain, α -tokoferol memiliki biopotensi yang terbesar dan menunjukkan aktivitas biologis vitamin E yang asli. Fungsi terpenting α -tokoferol (vitamin E) ialah sebagai antioksidan, sedangkan fungsi sampingnya adalah menstimulus respon imunologi.

Vitamin E juga dikenal memiliki efek peningkatan imunitas, beberapa penelitian menjelaskan bahwa peningkatan kadar vitamin E dalam tubuh berkorelasi dengan penurunan kejadian infeksi. Vitamin E berperan sebagai antioksidan karena ia mudah teroksidasi. Mudahnya α -tokoferol (vitamin E) mengalami oksidasi ini, mampu melindungi senyawa lain dari oksidasi. Karena aktivitasnya sebagai antioksidan, alfa-tokoferol (vitamin E) termasuk dalam pertahanan utama dalam menangkal bahaya oksigen reaktif (ROS), peroksidasi lipid. Kemampuan vitamin E

dalam menangkal radikal bebas ini akan menghentikan reaksi berantai yang diakibatkan radikal bebas.

4) Senyawa polifenol

Polifenol merupakan kelompok besar senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan yang paling melimpah pada tumbuhan. Polifenol mempunyai kemampuan menangkap radikal bebas (Buettner, 1996). Polifenol juga dapat menghambat, mengurangi, dan mencegah oksidasi radikal bebas yang bermanfaat bagi kesehatan. Polifenol sering terdapat dalam bentuk glikosida sehingga cenderung mudah larut dalam air. Berdasarkan struktur glikosida, polifenol bergabung dengan gula dalam suatu ikatan glikosidik. Senyawa ini banyak ditemukan dalam vakuola sel. Polifenol merupakan senyawa aromatik, dan menunjukkan absorbansi yang kuat di daerah UV. Termasuk ke dalam kelompok polifenol ini antara lain kelompok asam fenolat, kelompok flavonoid, kelompok lignin dll. Senyawa-senyawa yang sudah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan antara lain: quercetin, katekin, isoflavon, lignan, flavanon, ellagicacid, anthocyanidin, xanthohumol, resveratrol, epigallocatekin, katekin dan asam galat.

Polifenol telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat, karena kemampuannya menstabilkan elektron dari radikal bebas (Mustafa, dkk., 2020: 47–61). Beberapa senyawa dari polifenol memiliki aktivitas antihipertensi, antidiabetes, antikanker dan antimikrobia. Senyawa polifenol terdapat pada berbagai macam jenis buah-buahan dan sayur-sayuran. Kadar polifenol dapat dianalisis dengan melakukan ekstraksi dan menggunakan berbagai pelarut (Tamrin, 2007).

5) Flavonoid

Flavonoid ditemukan dan terdistribusi secara luas pada tanaman. Senyawa ini memiliki peran beragam di tanaman.

Salah satu kelompok flavonoid ditemukan sebagai pigmen kuning, merah, atau biru pada tanaman dan memiliki banyak peran sebagai pengusir serangga dan mencegah mikroba. Flavonoid dapat menghambat *Nicotinamida Adenine Dinucleotida Phosphate* (NADPH) oksidase melalui penghambatan ACE, peningkatan eNOS-spesifik, dan juga mengubah ekspresi siklooksigenase-2 (COX 2) (Baradaran, dkk., 2014: 358–367), sehingga flavonoid ini memiliki aktivitas antioksidan, antiinflamasi, immunostimulan dan antidiabetes.

Flavonoid dapat mencegah munculnya ROS karena memiliki efek antioksidan, secara langsung maupun tidak langsung (Akhlaghi & Brian, 2009: 309–317). Superoksida dan peroxynitrit dapat ditangkap oleh flavonoid secara langsung. Kemampuan flavonoid mereduksi peroxynitrit ini berkait dengan efek vasorelaksasi pembuluh darah sehingga memiliki efek pada pencegahan terjadinya penyakit kardio vaskuler. Flavonoid berperan sebagai antiinflamasi karena kemampuannya dalam menghambat sintesis beberapa jenis sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1 β , TNF- α , dan interferon- γ .

Sebuah penelitian melaporkan kandungan flavonoid dan fenolik tergolong tinggi pada ekstrak *H. sabdariffa* L. (Nurkhasanah, dkk., 2018: 851–856). Telah diketahui bahwa beberapa senyawa flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan tinggi, dan mekanisme kerja flavonoid melalui proses *scavenging* atau *chelating*.

6) Turunan asam sinamat

Asam sinamat termasuk dalam senyawa bahan alam yang bisa ditemukan di beberapa tanaman, misalnya kencur (*Kaempferia galangal*) dan kemenyan (*Styrax sp.*). Senyawa ini mempunyai bermacam-macam aktivitas biologis, yaitu antiinflamasi, antispasmodik, antibakteri, anestetik, antimutagenik, fungisida,

herbisida, serta penghambat enzim tironase. Beberapa contoh turunan asam sinamat antara lain adalah asam 4-hidroksisinamat, asam 4-hidroksi-3-metoksinamat dan asam 3,4-dihidroksisinamat yang potensial sebagai antioksidan, antiinflamasi dan analgesik. Asam sinamat dan turunannya juga berpotensi sebagai insektisida karena mempunyai struktur mirip dengan L-tirosin, memiliki aktivitas inhibisi enzim tirosinase sehingga bisa digunakan sebagai salah satu bahan tambahan dalam kosmetika, karena memiliki efek pencerah kulit.

Asam sinamat berbentuk kristal berwarna putih, cukup dapat larut dalam air, memiliki titik leleh 133°C , titik didih 300°C dan rumus kimia $\text{C}_6\text{H}_5\text{CHCHCOOH}$ atau $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_2$. Sama seperti asam kafeat, biosintesis asam sinamat berasal dari fenilalanin dan tirosin yang dihasilkan dari lintasan asam sinamat dan reaksi kelanjutannya.

7) Tannin

Tannin ialah sebuah senyawa ditemukan dengan sebaran yang luas pada tanaman. Tannin ditemukan pada bagian daun, buah masih mentah, batang, dan kulit kayu. Tannin yang ditemukan pada buah yang masih mentah, berperan sebagai energi dalam proses metabolisme, dan terdapat dalam bentuk tannin teroksidasi. Tannin termasuk senyawa kompleks yang ditemukan sebagai campuran polifenol yang sulit dipisahkan. Di alam bebas, tannin ditemukan di banyak tumbuhan tingkat tinggi.

Seringkali peningkatan produksi tannin berkaitan dengan beberapa penyakit tanaman. Oleh karena itu, diasumsikan bahwa peran biologis dalam tanaman yang mengandung banyak tannin dalam melindungi terhadap infeksi serangga atau hewan herbivora. Dalam farmakologi, ekstrak tumbuhan yang mengandung tannin digunakan sebagai astringen, obat diare, diuretic, antiinflamasi,

antiseptic, dan obat-obatan hemostatik.

Di industri, tannin dimanfaatkan sebagai pewarna tekstil, serta sebagai antioksidan dalam industri jus buah kemasan dan sebagai koagulan dalam industri karet. Baru-baru ini, tannin telah menarik minat ilmiah karena meningkatnya kasus penyakit mematikan seperti AIDS dan kanker (Khanbabaee, 2001: 641–649). Tannin merupakan metabolit sekunder polifenol dari sumber tanaman. Alam adalah sumber dari keanekaragaman hayati dari struktur stereokimia tinggi dan banyak yang memiliki aktivitas dan khasiat sebagai obat. Fakta bahwa aktivitas biologis dari ekstrak tumbuhan yang mengandung tannin telah dikenal sejak lama, terutama dua dekade terakhir. Dalam uji biologis ekstensif, tannin menunjukkan aktivitas antivirus dan sifat antibakteri, tetapi yang paling menonjol adalah aktivitas antitumor. Tannin jenis tertentu, mampu menghambat replikasi HIV secara selektif. Dalam kemajuan metodologi, teknik isolasi, dan analisis, banyak jenis tannin yang harus diidentifikasi manfaat-manfaatnya lebih lanjut (Khanbabaee, 2001: 641–649).

8) Karotenoid

Karotenoid seperti betakaroten, memiliki peran penting dalam proses penglihatan, sebagai precursor vitamin A. Karotenoid secara signifikan dapat mengurangi risiko kanker karena mampu bertindak secara efisien sebagai antioksidan yang kuat karena kemampuannya menangkal radikal bebas (Buckner, dkk., 2018: e275-e281). Karotenoid memiliki kisaran warna kuning hingga merah, oleh karenanya dapat dideteksi pada panjang gelombang 430-480 nm. Pada tumbuhan, karotenoid mudah dikenali, dari warna-warna cerah yang ditunjukkan yaitu: kuning, oranye, jingga, hingga merah (Fennema, 1996). Karotenoid, dibedakan dari pigmen alami seperti antosianin karena sifatnya yang tidak mudah

larut dalam air. Keberadaan karotenoid dalam sel dapat dijumpai di dalam plastid yang tidak berwarna hijau, kloroplas, kromoplas bunga, buah matang, sebagian jenis akar dan umbi, serta biji/benih. Karotenoid ada pada tanaman tingkat tinggi bahkan alga, jamur, bakteri, dan jaringan yang dapat berfotosintesis. Karotenoid juga dapat dijumpai pada sel hewan (Khanbabae, 2001: 641–649).

Senyawa karotenoid dapat diekstraksi dari bahan alam seperti semangka, labu, tomat, wortel dan pepaya. Sejauh ini, karotenoid sudah sangat banyak dikaji dan diketahui memiliki berbagai macam manfaat dan peran penting.

Karotenoid tidak bisa larut dalam pelarut yang berupa senyawa polar maupun air. Karotenoid hanya mampu larut dalam pelarut nonpolar semisal aseton, alkohol, dietil eter, dan kloroform, heksan dan petroleum eter. Dewasa ini juga mulai dikembangkan sintesis karotenoid. Struktur yang diperoleh adalah sama seperti yang terkandung dalam ekstrak karotenoid dari sumber alami. Sintesis dan modifikasi yang dilakukan pada struktur karotenoid dapat memengaruhi sifat-sifat fisika kimianya, serta aktivitas farmakologinya.

Sifat yang dimiliki karotenoid tergolong khas dan tidak dimiliki oleh zat kimia lainnya. Struktur molekul karotenoid menjadi pemegang kunci peran dan sifat karotenoid itu sendiri. Struktur karotenoid yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, sangat menentukan sifatnya sebagai antioksidan yang kuat. Secara umum, geometri molekul (yang meliputi ukuran, pola tiga dimensi, dan gugus fungsional) memainkan peran penting interaksi karotenoid dengan reseptornya. Interaksi yang tepat dalam sel, sub-sel, dan struktur molekul akan sangat memengaruhi aktivitasnya. Selain itu, sifat absorpsi cahaya dan kereaktifan karotenoid juga ditentukan oleh sistem ikatan rangkap konjugasi.

9) Kumarin

Kumarin memiliki kerangka yang serupa dengan asam sinamat. Namun, perbedaan terletak pada siklisisasi atom oksigen pada gugus karboksil kumarin. Dalam tumbuhan, kumarin berfungsi sebagai pertahanan terhadap penyakit dan hama karena memiliki sifat fungisidal dan antimikroba yang kuat (Sikder, dkk., 2018: 1317–1331). Senyawa ini tersebar luas di berbagai jenis tumbuhan, terutama pada famili Rutaceae, Umbelliferae, Leguminosae, dan Graminae.

Kumarin terdapat pada hampir semua bagian tumbuhan, seperti batang, daun, buah, akar, dan bunga. Senyawa ini merupakan turunan dari sikimat yang dihasilkan ketika fenilalanin mengalami deaminasi dan dihidroksilasi menjadi asam trans-hidroksisinamat. Kumarin memiliki berbagai aktivitas biologis, seperti antibakteri, antikoagulan darah, dan kemampuan untuk menghambat proses karsinogenesis.

10) Asam organik

Asam organik adalah senyawa organik yang memiliki gugus karboksil. Asam organik dibedakan berdasarkan jenis rantai karbon (alisiklik, alifatik, aromatik atau heterosiklik), derajat kejenuhan, substitusi, dan jumlah gugus fungsinya (Ihwah, dkk., 2018: 0-6). Senyawa asam organik banyak digunakan pada berbagai industri seperti industri kimia, makanan, dan farmasi, dengan peran sebagai bahan pengasam, bahan pengembang rasa, bahan aditif antimikroba, dan pengawet. Beberapa jenis asam organik, seperti asam laktat, asam malat, asam fumarate, asam pirogutamat, asam oksalat, asam askorbat, asam sitrat, dan asam tartrat, ditemukan dalam tanaman sebagai senyawa antara dalam proses metabolisme (Sitorus, dkk., 2015: 148).

Titration merupakan metode analisis yang dapat digunakan untuk menganalisis total asam organik, tetapi tidak cocok untuk analisis asam organik dalam buah-buahan yang mengandung banyak jenis asam organik. Kromatografi merupakan metode analisis yang lebih baik untuk menganalisis asam organik karena kemampuan pemisahannya. Kromatografi dapat dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis, kromatografi cair, dan kromatografi gas. Analisis kromatografi memiliki kelebihan yaitu hanya memerlukan sedikit sampel dan dapat menganalisis berbagai jenis asam organik. Teknik KCKT (Kromatografi cair kinerja tinggi) juga dapat digunakan untuk menganalisis asam organik. Teknik KCKT dapat dibedakan dalam 3 jenis yaitu fase normal (digunakan fase gerak non polar), fase terbalik (digunakan fase gerak polar), dan kromatografi penukar ion.

Bab 2

Radikal Bebas

Radikal bebas merujuk pada molekul, gugus, atau atom yang sangat tidak stabil dan reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di kulit terluarnya. Ada banyak jenis radikal bebas yang ada. Namun, yang paling banyak ada dalam sistem biologis tubuh adalah ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan RNS (*Reactive Nitrogen Species*) (Parwata, 2016: 1–54). Masing-masing akan dibahas pada poin pembahasan berikutnya. Radikal bebas (*free radical*) berasal dari atom atau molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan terluarnya. Karakteristik dari radikal bebas adalah sifatnya yang sangat reaktif. Karena sifatnya yang sangat reaktif, radikal bebas cenderung bereaksi dengan cepat dengan molekul-molekul di sekitarnya untuk mencuri elektron.

Radikal bebas bisa bersifat baik ataupun jahat tergantung pada keseimbangan jumlahnya dalam tubuh terhadap antioksidan. Jika radikal bebas dalam tubuh tidak seimbang, maka dapat menyebabkan kondisi yang disebut stres oksidatif yang pada akhirnya dapat mengganggu fungsi organ dan menyebabkan penyakit. Dalam bidang kimia, radikal bebas merujuk pada atom atau molekul yang memiliki elektron tak berpasangan (*lonepaired electron*). Sifat radikal bebas yang serupa dengan oksidan terletak pada kecenderungannya menarik

elektron. Radikal bebas dapat bertindak sebagai penerima elektron. Namun, tidak semua oksidan memiliki sifat radikal bebas (Irianti, dkk., 2021). Radikal bebas memiliki efek berbahaya yang lebih besar dibandingkan dengan oksidan yang bukan radikal.

Jumlah radikal bebas yang berlebihan dapat merusak jaringan normal dalam tubuh. Dalam jumlah yang banyak, radikal bebas dapat mengganggu sintesis DNA, pembuluh darah, merusak lapisan lipid pada dinding sel, produksi prostaglandin, serta merusak sel dan mengurangi kemampuan sel untuk beradaptasi dengan lingkungannya. Radikal bebas memiliki efek merusak jauh lebih besar dibandingkan dengan oksidan non radikal. Akibat reaktivitasnya yang tinggi, radikal bebas tidak stabil dan kemudian berumur sangat pendek sehingga sulit dideteksi secara langsung. Walau pada umumnya radikal bebas memiliki reaktivitas yang tinggi dan masa hidup yang pendek, tetapi terdapat beberapa jenis radikal bebas yang relatif stabil. Radikal bebas mempunyai sifat reaktivitas yang tinggi karena kecenderungannya menarik elektron serta dapat mengubah suatu molekul menjadi bersifat radikal melalui suatu reaksi berantai.

Sebenarnya, proses fisiologis tertentu dalam tubuh memerlukan keberadaan radikal bebas, terutama untuk membantu dalam transportasi elektron. Pada kadar normal, radikal bebas diperlukan untuk memfasilitasi pertumbuhan sel dan membantu sel darah putih untuk memerangi benda asing, seperti kuman, dengan cara menghancurkannya (fagositosis).

Sumber radikal bebas dapat diperoleh dari luar dan dalam tubuh kita. Sumber dari luar seperti paparan sinar matahari, polusi udara, merokok, obat-obatan, senyawa pencemar/polutan, pestisida, makanan yang tidak sehat dan zat-zat berbahaya lainnya bahkan dari akibat radiasi. Walaupun misalnya kita tidak terpapar sumber dari luar tersebut karena hanya di rumah saja, ternyata tubuh kita sendiri dapat menghasilkan senyawa radikal bebas (Suryohudoyo, 1993: 1-11), yaitu

dalam tubuh, proses pembakaran sel dan oksidasi terjadi saat bernapas, dan terjadi sebagai bagian dari metabolisme sel. Aktivitas fisik yang berlebihan atau olahraga yang intens, serta keadaan peradangan, juga dapat menyebabkan proses ini terjadi (Parwata, 2016: 1–54). Sehingga, sebenarnya tubuh kita memang pasti akan terpapar oleh radikal bebas. Radikal bebas yang dihasilkan oleh tubuh sendiri merupakan senyawa yang sebenarnya berasal dari proses biologis normal atau fisiologis, tetapi dalam kondisi tertentu senyawa-senyawa tersebut hadir dalam jumlah yang besar (Suryohudoyo, 1993: 1-11).

A. Sumber Radikal Bebas

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (radikal endogen) atau dari lingkungan (radikal eksogen). Radikal bebas dari lingkungan dapat berupa asap rokok, asap dari pembakaran bahan bakar fosil, paparan sinar ultraviolet, dan sebagainya. Sementara sumber radikal bebas endogen bersumber dari metabolisme energi di mitokondria misalnya peroksida. Berikut adalah penjelasan lebih lanjut mengenai radikal endogen dan radikal eksogen.

1. Radikal Endogen

Radikal bebas dapat timbul dari sumber endogen, yakni dari dalam tubuh manusia itu sendiri. Sumber endogen ini disebut juga sebagai radikal endogen. Di bawah ini terdapat asal-usul radikal bebas endogen yang muncul dari dalam tubuh manusia:

a) Autoksidasi

Autoksidasi adalah hasil dari proses metabolisme aerob yang menghasilkan molekul-molekul seperti katekolamin, myoglobin, hemoglobin, sitokrom C yang tereduksi, dan thiol. Produk-produk tersebut dapat mengalami autoksidasi dan menghasilkan oksigen reaktif.

b) Oksidasi Enzimatik

Enzim oksidatif adalah jenis enzim yang mampu menghasilkan radikal bebas seperti *xanthine oxidase*, *amino acid oxidase*, *lipoxygenase*, *aldehid oxidase*, dan *prostaglandin synthase*.

c) *Respiratory Burst*

Adalah proses sel fagositik menggunakan oksigen dalam jumlah yang signifikan sekitar 70-90% untuk melaksanakan tugas fungsinya. Selama proses ini, oksigen digunakan untuk menghasilkan superoksida, yang merupakan zat awal untuk pembentukan radikal bebas.

2. Radikal Eksogen

Radikal eksogen merujuk pada jenis radikal bebas yang terbentuk dari luar tubuh, melalui berbagai sumber sebagai contohnya sebagai berikut:

a) Obat-obatan

Obat meningkatkan produksi radikal bebas dengan meningkatkan tekanan parsial oksigen. Jenis obat tersebut dapat berupa obat antikanker, antibiotik kuinon, dan asam askorbat yang mempercepat peroksidasi lipid bila digunakan secara berlebihan.

b) Radiasi

Penggunaan radioterapi dimungkinkan dapat menjadi penyebab terjadinya kerusakan jaringan yang disebabkan oleh radikal bebas. Radiasi itu sendiri terbagi menjadi radiasi elektromagnetik dan radiasi partikel. Radiasi elektromagnetik terdiri dari sinar-X dan sinar Gamma, sedangkan radiasi partikel dapat berupa radiasi partikel elektron, foton, alfa, neutron, dan beta.

c) Asap Rokok

Rokok mengandung sejumlah besar senyawa oksidatif, termasuk radikal bebas aktif dan destruktif seperti aldehida,

peroksida, dan epoksida. Penelitian melaporkan, bahwa perokok aktif memiliki jumlah neutrophil di saluran pernapasan bagian bawah cenderung meningkat, yang menunjukkan terjadinya peningkatan produksi radikal bebas.

B. Tahap Pembentukan Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul dengan satu elektron di luar kulit atomnya yang membuatnya sangat reaktif, sehingga untuk menyempurnakan struktur elektronnya cenderung mencari pasangan elektron dari molekul lain. Radikal bebas dapat terbentuk dari berbagai sumber, termasuk pajanan atau paparan sinar matahari, polusi udara, asap rokok, dan paparan zat kimia yang terdapat dalam makanan, obat-obatan, dan produk kecantikan. Radikal bebas juga terbentuk secara alami di dalam tubuh selama proses metabolisme, terutama saat tubuh mengalami stres akibat paparan radiasi.

Radikal bebas sangat mampu menyebabkan kerusakan pada sel-sel tubuh, terutama pada bagian DNA dan protein. Kerusakan ini dapat menyebabkan mutase genetik yang dapat meningkatkan risiko terjadinya penyakit seperti kanker, penyakit jantung, dan penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu, tubuh memiliki mekanisme untuk mengurangi efek buruk radikal bebas, termasuk dengan menggunakan antioksidan yang dapat menangkap serta menetralkan radikal bebas sebelum radikal bebas tersebut menyebabkan kerusakan. Namun, jika terlalu banyak radikal bebas terbentuk atau jika sistem antioksidan tubuh tidak berfungsi dengan baik, maka radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan yang berpotensi menyebabkan penyakit.

Secara umum, radikal bebas dihasilkan sel melalui reaksi transfer elektron, menggunakan mediator enzimatik dan non-enzimatik. Produksi radikal bebas dalam sel dapat terjadi terus menerus atau sebagai respons terhadap rangsangan. Produksi radikal bebas dalam sel yang terjadi secara rutin/terus-menerus misalnya pada

superoksida diproduksi oleh aktivasi fagosit dan reaksi yang dikatalisis seperti reduktase ribonukleotida. Produksi radikal bebas terjadi ketika bakteri berinteraksi dengan fagosit yang teraktivasi, karena terjadinya kebocoran superoksida, hidrogen peroksida, dan ROS lainnya sebagai respons terhadap rangsangan.

Proses pembentukan radikal bebas terbagi menjadi tiga tahap, yaitu:

1. Tahap Inisiasi

Merupakan tahap awal dalam pembentukan radikal bebas. Tahap awal ini melalui beberapa proses yaitu dengan proses ekstrusi, suhu tinggi, dan tekanan pada saat pemotongan polimer. Proses ini menimbulkan radikal alkil. Konsentrasi hidroperoksida meningkat setelah oksidasi dimulai. Substrat oksidatif mampu bereaksi secara langsung dengan oksigen dan menghasilkan radikal khususnya pada saat temperatur tinggi.

2. Tahap Propagasi

Tahap propagasi adalah ketika rantai radikal diperpanjang atau reaksi berlanjut sehingga radikal bebas diubah menjadi radikal bebas lainnya. Selama tahap ini, terjadi oksidasi lemak yang menghasilkan radikal peroksida. Proses oksigenasi terjadi sangat cepat dan memerlukan energi yang hampir mendekati nol. Hal ini menyebabkan konsentrasi radikal peroksida akan terbentuk dengan nilai yang lebih besar. Fase propagasi dapat terjadi beberapa kali sebelum diakhiri oleh radikal peroksida menjadi bentuk non-radikal. Dekomposisi homolitik hidroperoksida disebabkan oleh reaksi propagasi, yang berakibat pada peningkatan laju inisiasi dengan menghasilkan radikal bebas (Irianti, dkk., 2021). Laju reaksi molekul oksigen dengan radikal alkil untuk membentuk radikal peroksil jauh lebih tinggi daripada laju reaksi radikal peroksil dengan atom hidrogen turunan substrat.

3. Tahap Terminasi

Tahap ini, senyawa radikal bebas bereaksi dengan radikal bebas lain atau mengikat radikal bebas sehingga potensi perambatannya rendah. Reaksi terminasi yang signifikan terjadi ketika konsentrasi oksigen sangat rendah. Pada tahap terminasi ini, radikal bebas bereaksi satu sama lain, sehingga akan terbentuk spesies yang bersifat non radikal. Pada saat yang sama, hidroperoksida didekomposisi menjadi produk asam keto, alkohol, dan substrat lain yang lebih stabil.

Radikal bebas diduga menyebabkan kerusakan DNA, peroksidasi lipid membran, dan apoptosis. Proses oksidasi pada senyawa lipid dapat terjadi ketika senyawa radikal bebas berinteraksi dengan *Poly Unsaturated Fatty Acids* (PUFA). Tanda-tanda peroksidasi lipid dapat ditemukan pada hasil produknya, seperti lipid hidroperoksida, MDA (*Malondialdehyde*), dan isoprostan.

C. Oksidan dan Dampak yang Ditimbulkan

Oksidan merupakan molekul oksigen yang reaktif dan tidak stabil karena pada orbit terluarnya terdapat elektron yang tidak memiliki pasangan. Oksidan melakukan reaksi dengan molekul lain yang berada di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektronnya. Proses ini terjadi secara terus-menerus bahkan rutin di dalam tubuh yang berdampak, penyakit akan timbul apabila proses ini tidak dapat dihentikan.

Faktor endogen maupun eksogen dapat memicu proses munculnya oksidan. Sehingga, dikenal istilah oksidan endogen (oksidan yang bersumber dari dalam tubuh) dan oksidan eksogen (oksidan yang berasal dari luar tubuh). Oksidan yang bersifat endogen (oksidan yang berasal dari dalam tubuh). Oksidan endogen merupakan senyawa yang sebenarnya berasal dari proses biologi normal, tetapi karena suatu

sebab terdapat dalam jumlah yang berlebihan misalnya proses oksidasi xantin, proses oksidasi makanan, dan aktivitas fisik yang berlebihan. Sementara oksidan eksogen misalnya NO_2 , NO, bakteri, virus ozon, asap rokok, dan udara tercemar akibat kendaraan bermotor atau pabrik dan tempat industri. Dari sekian sumber oksidan yang bersifat eksogen, asap rokok termasuk dalam substansi yang memiliki sumbangsih paling tinggi terhadap pencemaran udara yang kemudian menyebabkan timbulnya oksidan. Asap rokok diketahui dapat menyebabkan jaringan paru-paru berubah sifat fisiologi dan biokimianya.

1. Dampak Positif Oksidan

Oksidan dapat disebut sebagai molekul oksigen yang menimbulkan banyak kerugian atau dampak negatif. Namun, dengan dampak negatif ini, tubuh dapat memanfaatkannya untuk melawan serbuan organisme patogen yang seringkali melawan pertahanan tubuh. Dalam menghadapi ancaman dari luar ini, Sang Pencipta telah mengaruniakan sel-sel khusus yang ada dalam tubuh yang disebut sebagai *inflammatory cells*. *Inflammatory cells* ini dapat berupa granulosit, monosit, dan makrofag. Misalnya saja pada penelitian (Aris & Arief. 2017: 22–29) mengenai peranan stress oksidatif pada proses penyembuhan luka. Mereka menyimpulkan bahwa stress oksidatif yang ditimbulkan oleh *reactive species* berupa *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS), mempunyai efek negatif dan merugikan apabila berlebihan, tetapi juga menguntungkan karena berperan dalam mekanisme penyembuhan luka dengan proses angiogenesis, inflamasi, dan pembentukan matrik. Pemberian antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas, dapat meminimalisir dan juga menghambat kejadian stress oksidatif. Pada fase awal reaksi inflamasi, neutrophil dan makrofag masuk ke dalam jaringan yang mengalami cedera dan sel-sel ini memproduksi RNS. Stress oksidatif yang terjadi merupakan kondisi yang menggambarkan ketidakseimbangan antara

antioksidan dan prooksidan karena perannya yang mampu menjaga dari kemungkinan terjadinya kerusakan jaringan.

2. Dampak Negatif Oksidan

Meskipun oksidan berperan dalam sistem pertahanan tubuh dengan menghancurkan mikroorganisme, tetapi apabila proses tersebut menyebabkan radang hebat yang melibatkan banyak *inflammatory cells*, maka kerusakan jaringan tidak dapat dihindarkan. Oksidan dapat merusak sel-sel jaringan tubuh.

D. Prooksidan

Prooksidan dapat berasal dari antioksidan (misalnya saponin, alkaloid, dan tannin) yang terakumulasi dalam konsentrasi tinggi. Pada konsentrasi yang tinggi, aktivitas antioksidan dapat berubah menjadi prooksidan yang dapat merusak sel (Suryani & Endang, 2013: 134–137). Ketika dosis antioksidan dan prooksidan tidak seimbang atau kadar antioksidan tinggi sedangkan prooksidannya rendah, maka tubuh akan membentuk senyawa prooksidan untuk menyeimbangkan kadarnya dengan antioksidan. Hal ini akan membuat sel-sel radikal bebas.

Prooksidan adalah senyawa yang dapat mengkatalisis terjadinya oksidasi seperti Cu, Fe, dan sebagainya. Aktivitas prooksidan mampu menurunkan tingkat glutathion yang mengakibatkan hepatotoksitas. Prooksidan erat kaitannya dengan endobiotik atau xenobiotic yang menginduksi stres oksidatif baik oleh generasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau dengan menangkal sistem antioksidan. Hal ini dapat mencakup semua radikal bebas yang berupa molekul reaktif yang terkandung dalam sel atau jaringan. Prooksidan dapat dikategorikan menjadi beberapa kategori, antara lain sebagai berikut:

Tabel 1. Klasifikasi prooksidan dan mekanisme umumnya membentuk stres oksidatif (Polidori, dkk., 2005: 841–852).

No.	Kelas/Klasifikasi	Contoh	Mekanisme
1.	Obat-obatan	Obat umum yang dijual bebas seperti analgesic (parasetamol) atau obat antikanker (metotreksat)	Generasi ROS yang mengarah pada perubahan makromolekul yang akhirnya dapat merusak jaringan terutama hati dan ginjal
2.	Logam transisi	Magnesium, besi, tembaga, seng, dan lain-lain	Logam-logam ini menginduksi reaksi Fenton dan reaksi Habes-Weiss menyebabkan pembentukan ROS yang berlebihan. Magnesium kronis adalah penyakit prooksidan klasik. Sedang yang lainnya bisa menjadi hemochromatosis karena kadar zat besi yang tinggi atau penyakit Wilson karena tembaga
3.	Pestisida	BHC, DDT, dan lain-lain	Stimulasi produksi radikal bebas, induksi lipid peroksidasi, perubahan enzim antioksidan dan sistem redoks glutathione
4.	Latihan/Aktivitas fisik	Lari, angkat berat	Relaksasi-kontraksi otot melibatkan produksi ROS. Latihan keras menyebabkan ROS yang berlebihan
5.	Kecemasan mental	Ketegangan, ketakutan	Ketidakeimbangan dalam sistem redoks berperan dalam peradangan saraf dan degenerasi saraf, disfungsi mitokondria, perubahan sinyal saraf, dan penghambatan neurogenesis
6.	Patofisiologi	<i>Local ischemia</i> /iskemia lokal – kurangnya aliran darah ke jaringan atau organ tubuh yang disebabkan oleh gangguan di pembuluh darah	Menimbulkan peningkatan generasi ROS

No.	Kelas/Klasifikasi	Contoh	Mekanisme
7.	Faktor lingkungan	Cuaca ekstrem (panas, dingin, hujan badai)	Selama adaptasi, fluiditas membran mitokondria menurun dan dapat mengganggu transfer elektron, sehingga meningkatkan produksi ROS
8.	Antioksidan	Asam askorbat, vitamin E, polifenol	Bertindak sebagai prooksidan dalam keadaan tertentu. Misal: logam berat

Beberapa antioksidan flavonoid yang populer dan terkenal telah dilaporkan dapat bertindak sebagai prooksidan ketika logam transisi tersedia. Hal ini pernah ditemukan pada riset *mutagenic in vitro* (Polidori, dkk., 2005: 841–852). Aktivitas antioksidan dan aktivitas prooksidan yang diprakarsai oleh tembaga flavonoid tergantung pada strukturnya. Substitusi OH diperlukan untuk aktivitas antioksidan flavonoid (Rice-Evans, dkk., 1995: 375–383). Flavon dan flavonon, yang tidak memiliki substitusi OH dan yang menyediakan struktur kimia dasar untuk flavonoid, tidak menunjukkan aktivitas antioksidan atau aktivitas tembaga prooksidan. Prooksidan yang diinisiasi tembaga, aktivitas flavonoid juga tergantung pada jumlah substitusi OH bebas pada strukturnya. Peningkatan kuatnya aktivitas prooksidan dapat terjadi apabila semakin banyak juga substitusi OH. O-metilasi dan mungkin juga O-modifikasi lainnya dari substitusi OH flavonoid menonaktifkan kedua antioksidan tersebut dan aktivitas prooksidan dari flavonoid.

Pada sebuah penelitian menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan quercetin lebih baik daripada monoglukosida dalam sistem pengujian di mana peroksidasi lipid difasilitasi oleh radikal oksigen berair (Ioku, dkk., 1995: 99-104). Luteolin juga terbukti secara signifikan lebih kuat antioksidannya dari dua glikosida (Igile, dkk., 1994: 2445–2448).

Flavonoid umumnya terdapat dalam makanan sebagai O-glikosida dengan gula terikat pada posisi C3. Metilasi atau glikosidik modifikasi

substitusi OH menyebabkan inaktivasi aktivitas prooksidan yang diprakarsai logam transisi dari flavonoid.

Perlindungan yang diberikan oleh buah-buahan dan sayuran terhadap penyakit, termasuk kanker dan penyakit kardiovaskular, telah dikaitkan dengan berbagai antioksidan, termasuk flavonoid, yang terkandung dalam makanan ini. Flavonoid seperti quercetin dan kaempferol, menginduksi kerusakan DNA nuklir dan peroksidasi lipid dengan adanya logam transisi. Hal ini merupakan tindakan prooksidan yang diprakarsai tembaga secara *in vivo* dari flavonoid dan antioksidan lain (termasuk asam askorbat dan tokoferol) umumnya tidak dianggap signifikan, karena ion tembaga sebagian besar akan dianggap asing atau diasingkan dalam jaringan, kecuali dalam kasus toksisitas logam. Pencegahan peroksidasi lipid yang diinduksi zat besi dalam hepatosit oleh beberapa flavonoid termasuk quercetin diketahui baik (Weiss, dkk., 1994: 969–976).

Asam askorbat memiliki efek antioksidan dan prooksidan, tergantung pada dosis (Seo & Lee, 2002: 72-77). Potensi elektron rendah dan stabilitas resonansi askorbat dan radikal ascorbyl telah memungkinkan asam askorbat sebagai antioksidan yang memiliki hak istimewa (*privilege*) (Buettner, 1996: 532–541). Pada tikus yang diberi asam askorbat saja, asam askorbat telah diketahui dapat bertindak sebagai inhibitor CYP. Aktivitas serupa juga telah diamati untuk antioksidan quercetin lainnya (Zhang, dkk., 2006: 1171–1177) dan kitosan oligosaccharides (Yao, dkk., 2012: 1171–1177), yang dapat bertindak sebagai inhibitor CYP potensial. Secara khusus, fase I gen biotransformasi xenobiotic, yaitu CYP1A1, CYP2E1, dan CYP2C9, sebelumnya telah diketahui dapat menurunkan regulasi pada tikus betina saat bersama antioksidan resveratrol (Hebbar, 2005: 2299–2314).

Peran antioksidan serta prooksidan asam askorbat dosis rendah (30 dan 100 mg/kg BB) dan dosis tinggi (1000 mg/kg BB), masing-masing diketahui berpengaruh pada kasus iskemia dan mengalami stress

oksidatif. Dalam penelitian ini, hewan uji berupa tikus mengalami iskemia diberikan asam askorbat secara intravena dengan dosis rendah maupun tinggi tersebut, diketahui dapat menurunkan kejadian iskemia (Seo & Lee, 2002: 72-77). Aktivitas prooksidan/antioksidan *in vivo* dari betakaroten dan likopen juga ditemukan bergantung pada interaksinya dengan membran biologis dan molekul ko-antioksidan lainnya seperti vitamin C atau E (Young & Lowe, 2001: 20-27).

Peningkatan asam lipoat dan O_2 mitokondria dan submitochondrial yang diinduksi DHLA O_2 diproduksi di hati tikus. Penggunaan ginseng dan *Eleutherococcus senticosus* (Siberian ginseng) dianggap dapat meningkatkan kapasitas tubuh untuk mentolerir tekanan eksternal, mengarah pada peningkatan kinerja fisik atau mental (Schulz, dkk., 1998). Meskipun literatur ekstensif yang mendokumentasikan adaptogenik, tetap terdapat efek dalam sistem hewan laboratorium, hasil dari studi klinis manusia saling bertentangan dan bervariasi (Schulz, dkk., 1998). Namun, ada bukti bahwa ekstrak ginseng dan *Eleutherococcus sp.* dapat memiliki efek imunostimulasi dalam manusia, dan ini dapat berkontribusi pada adaptogen atau tonik efek dari tanaman ini (Schulz, dkk., 1998). Tanaman ginseng diketahui banyak mengandung senyawa ginsenosides pada bagian akar, dan memiliki aktivitas antioksidan serta dapat menghambat peradangan atau inflamasi (Chandra, dkk., 2022).

Dari studi laboratorium, telah disarankan bahwa situs target farmakologis untuk senyawa ini melibatkan aksis hipotalamus-pituitaryadrenal karena efek yang diamati pada tingkat serum hormone adrenokortikotropik dan kortikosteron (Huang, 1999). Namun, perlu dicatat bahwa efek keseluruhan dari ginsenosides (senyawa pada ginseng yang diduga memiliki efek antiinflamasi, menurut hasil percobaan dalam *Journal of Traditional Medicine*) bisa sangat kompleks karena potensinya untuk beberapa tindakan bahkan dalam satu jaringan (Attele, dkk., 1999: 1685–1693).

Flavonoid yang ada dalam ekstrak ginkgo ada terutama sebagai turunan glikolisasi dari kaempferol dan quercetin (Blumenthal and Goldberg, 2000: 487). Glikosida flavonoid ini telah terbukti dapat menghilangkan radikal bebas dengan sangat efektif (Huang, 1999). Glikosida flavonoid dipercaya dapat bertindak kolektif dari komponen-komponen lain dan mengarah untuk mengurangi kerusakan dan meningkatkan fungsi pembuluh darah (Schulz, dkk., 1998).

Tergantung pada jenis dan tingkat *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS), durasi paparan, status antioksidan jaringan, paparan radikal bebas dan metabolitnya menyebabkan respon yang berbeda, misalnya peningkatan proliferasi, siklus sel terputus, apoptosis, atau nekrosis (Halliwell, 2015). Contoh spesifiknya ialah antioksidan hidrofilik dan asam askorbat (vitamin C). Asam askorbat bereaksi dengan radikal bebas guna menghasilkan asam semidehidro atau dehydroascorbic acid. Dehydroascorbic acid kemudian diregenerasi oleh enzim antioksidan yang ada pada organisme (reduktasi asam semidehidroaskorbat dan asam dehidroaskorbat reduktase) kembali ke fungsi askorbat. Dengan adanya ion logam transisi, asam askorbat menguranginya dan teroksidasi menjadi dehydroascorbic acid. Hidrogen peroksida yang terbentuk dalam reaksi selanjutnya bereaksi dengan tereduksi ion logam yang mengarah ke generasi radikal hidroksil melalui reaksi tipe fenton. Ion besi tidak pernah terbentuk dalam bentuk bebas dalam jaringan, oleh karena itu terjadi fenton dengan jenis reaksi *in vivo* adalah suatu keditakmungkinan.

Baru-baru ini, toksisitas asam askorbat juga telah dikaitkan terhadap autooksidasinya. Asam askorbat bisa dioksidasi dalam lingkungan ekstraseluler dengan adanya ion logam untuk asam dehidroaskorbat, yang diangkut ke dalam sel melalui transporter glukosa (GLUT). Pergerakan elektron ini mengubah keadaan redoks sel yang memengaruhi ekspresi gen.

E. Reactive Species

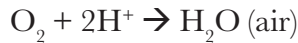
Kelebihan produksi *reactive species* ini akan bersifat beracun pada tubuh. Efek yang ditimbulkan memberikan efek sitostatik, kerusakan membran dan menyebabkan apoptosis sel dan nekrosis. Sel substansial berkumpul untuk melindungi dari efek reaktif (*reactive species*). Jika sumber *reactive species* sama, tetapi target kerusakan oksidatif yang berbeda diukur, hasilnya dapat saja berbeda.

Kerusakan DNA oksidatif merupakan faktor risiko untuk perkembangan kanker, dan kerusakan protein oleh *reactive species* yang berpotensi menjadi penyakit kanker, kardiovaskular, dan penyakit neurodegeneratif (Davies and Dean, 1997). *Reactive species* dapat musnah karena ditangkap oleh vitamin C, termasuk superoksida dan radikal peroksil, oksigen singlet, ozon peroksinitrit, nitrogen dioksida, dan asam hipoklorit. Vitamin C juga dapat meregenerasi antioksidan dan molekul kecil lainnya, seperti tokoferol, glutathione, dan karoten dari masing-masing *reactive species*. Berikut adalah beberapa penjelasan lebih lanjut mengenai jenis *reactive species*.

1. Reactive Oxygen Species (ROS)

Spesies oksigen reaktif (ROS) adalah produk sampingan berupa ion dan molekul reaktif, yang berasal dari metabolisme oksigen pada konsentrasi rendah di dalam sel. Radikal bebas bersifat tidak stabil dan memiliki waktu paruh biologis pendek. *Reactive Oxygen Species* (ROS) merupakan satu dari jenis radikal bebas yang memengaruhi berbagai mekanisme seluler, seperti proliferasi, metabolisme, dan diferensiasi. ROS adalah produk metabolisme sel normal atau sel yang terkena paparan zat penyebab inflamasi atau peradangan lainnya. ROS terutama merupakan hasil reaksi fisiologis (ROS endogen), yaitu hasil metabolisme sel normal, dan sebagian kecil merupakan hasil paparan dari eksternal (ROS eksogen), yaitu oksigen reaktif yang dihasilkan dari radiasi, polusi lingkungan, bakteri, infeksi jamur, virus, dan lain-lain.

Reactive Oxygen Species (ROS) adalah radikal bebas turunan oksigen yang paling melimpah dalam sistem biologis manusia. Oksigen secara kimiawi diberi simbol “O”. Zat ini diperoleh dalam bentuk molekul diatomik di udara, yaitu O₂. Dalam keadaan normal, pada rantai pernapasan, oksigen bersama ion hidrogen akan membentuk 1 molekul H₂O (air).



Selain itu, oksigen juga mampu menjadi gas mutagenik beracun yang dikenal sebagai ROS, yang merupakan senyawa oksigen reaktif. Reaksi oksidatif yang terus-menerus terjadi, tetapi oksigennya bersifat toksik, dapat memicu terbentuknya ROS ini. Ketidakseimbangan ROS dengan antioksidan juga dapat memicu terjadinya stres oksidatif. Sebagian besar *Reactive Oxygen Species* (ROS) dihasilkan dari proses metabolisme sel normal dalam tubuh (ROS endogen), sedangkan sisanya berasal dari paparan zat atau radikal eksternal dari luar tubuh (ROS eksogen) (Parwata, 2016: 1–54). Pada prinsipnya, *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat dibagi menjadi dua kategori, yaitu senyawa oksigen reaktif yang berifat radikal dan senyawa oksigen reaktif yang tidak bersifat radikal.

Tabel 2. Klasifikasi ROS (*Reactive Oxygen Species*)

ROS radikal	
Oksigen	O ₂ **
Ion superoksida	O ₂ **
Nitrit oksida	NO*
Alkoksil	RO*
Peroksil	ROO*
Hidroksil	OH*
ROS non radikal	
Peroksinitrit	ONOOH
Hidrogen peroksida	H ₂ O ₂
Aldehid	HOCR

Ozon	O_3
Asam hipoklorit	HOCL
Singlet oksigen	${}_1O^2$
Peroksida organik	ROOH

Senyawa oksigen reaktif yang bersifat non radikal (non radikal oksigen) disebut juga dengan oksidan. Tubuh menghasilkan ROS secara fisiologis, baik dalam bentuk radikal bebas maupun oksidan. Sementara mengenai sumber penghasil ROS, ROS dapat dihasilkan di mitokondria, fagosit, xantin oksidase, peroksisom, asam arakhidonat, dan sebagainya. Bahan-bahan tersebut diproduksi oleh tubuh untuk membunuh bakteri yang memasuki tubuh. Namun, jika produksi radikal bebas atau oksidan berlebihan, antioksidan atau anti radikal bebas seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GPx) akan digunakan untuk menetralkan bahan tersebut. Jika radikal bebas atau oksidan lebih banyak daripada antioksidan, maka ini disebut sebagai stres oksidatif.

Terbentuknya *Reactive Oxygen Species* (ROS) tidak terlepas dari reaksi redoks (reduksi-oksidasi), yaitu sebagai reaksi pengikatan dan pelepasan oksigen. Pada dasarnya, reaksi redoks terdiri dari:

a. Penambahan oksigen

Yaitu reaksi pengikatan oksigen pada suatu zat atau senyawa.

b. Dehidrogenase

Yaitu reaksi yang menyebabkan pelepasan hidrogen dari suatu zat atau senyawa.

c. Pemindahan elektron

Yaitu reaksi dengan cara melepaskan elektron yang disertai dengan penambahan muatan positif dan pengurangan muatan negatif.

Jumlah *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat meningkat secara signifikan dalam kondisi stres yang berbeda, hal tersebut dapat menyebabkan kerusakan sel yang signifikan. Konsentrasi tinggi *Reactive*

Oxygen Species (ROS) dapat menyebabkan penumpukan kolesterol pada dinding pembuluh darah, yang dapat memicu aterosklerosis atau penyakit jantung koroner. ROS juga dapat memicu berbagai penyakit terkait usia, seperti Alzheimer, diabetes, kanker, Parkinson, peradangan, jantung koroner, stroke, gagal ginjal, penuaan dini, dan hampir semua penyakit kardiovaskular. Oleh karena itu, diperlukan senyawa antioksidan untuk menetralkan ROS dan mengurangi efek kerusakan sel pada organisme yang disebabkan oleh radikal bebas.

2. *Reactive Nitrogen Species* (RNS)

Reactive Nitrogen Species (RNS) merupakan salah satu bentuk umum dari radikal bebas. RNS sering dianggap sebagai subkelas dari ROS, yang terdiri dari senyawa *nitrous oxide* (N_2O), *peroxynitrite*, *nitroxyl anion* (HNO), *nitric oxide* (NO), dan *peroxynitrous acid*. *Reactive Nitrogen Species* (RNS) adalah senyawa yang terbentuk dari oksida nitrat, dan keberadaannya dalam tubuh dapat menyebabkan stres nitro-oksidatif. Jumlah oksida nitrat (NO) yang berlebih dapat memicu produksi RNS yang berperan dalam patofisiologi beberapa penyakit, termasuk kanker.

Reactive Nitrogen Species (RNS) merujuk pada kelompok molekul antimikroba yang berasal dari oksida nitrat (NO) yang diproduksi oleh aktivitas enzim oksida nitrat sintase 2 yang dapat diinduksi ($iNOS_2$) (Fang, 2004: 820–832). RNS dihasilkan melalui metabolisme sel normal aerob yang menghasilkan spesies organik reaktif di organel seperti mitokondria dari mikrosom. Biasanya, spesies nitrogen reaktif bermanfaat karena berhubungan dengan proses seluler seperti transduksi sinyal, pemantauan ketegangan O_2 , ekspresi gen, tonus pembuluh darah, dan aktivasi enzim. Jika terjadi peningkatan kadar nitrogen reaktif yang signifikan, maka dapat menyebabkan kerusakan pada sel-sel tubuh sehingga perlu diatasi dengan berbagai senyawa antioksidan (Valavanidis, 2013: 3886–3907).

Meningkatnya kadar RNS bisa saja menyebabkan stres oksidatif

(Schieber & Chandel, 2014: 453–462). Misalnya, sebagai hasil dari respons inflamasi terhadap patogen, RNS (*Reactive Nitrogen Species*) dihasilkan oleh nitrat oksida sintase, dan keberadaannya dapat menyebabkan stres nitro/oksidatif (Liaudet, dkk., 2009: 4809–4814). RNS (*Reactive Nitrogen Species*) ialah termasuk radikal bebas yang menyebabkan stres nitro oksidatif serta dianggap lebih berbahaya dibandingkan dengan stres oksidatif karena dalam jumlah yang lebih banyak, senyawa ini dapat menyebabkan kerusakan pada DNA dengan membentuk senyawa CO_3^- dan NO_2^- . Hal ini dapat menyebabkan lesi pada DNA dan memicu tumorigenesis. Untuk mengurangi pembentukan RNS, dapat dilakukan perawatan dengan menggunakan antioksidan. Antioksidan ini dapat mengurangi adduct oksidatif pada DNA dan mengurangi kerusakan DNA sehingga dapat menghambat terjadinya tumor (karsinogenesis) (Rahmah, dkk., 2018: 166–172).

Reactive Nitrogen Species (RNS) dibentuk sebagai produk sampingan dari banyak proses seluler endogen, sebagai respons terhadap infeksi, dan setelah terpapar berbagai faktor lingkungan. Peningkatan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) dapat menjenuhkan sistem antioksidan dan menyebabkan stres oksidatif. Senyawa reaktif yang merupakan bagian dari fungsi normal seringkali dikaitkan dengan kerusakan oksidatif mitokondria. Konsep tersebut menyatakan bahwa stres oksidatif dan disfungsi mitokondria atau sitotoksitas dianggap identik. Lebih lanjut, RNS mampu mengubah respon seluler (Lee, dkk., 2012: 532–540). RNS terdapat beberapa jenis, yaitu sebagai berikut:

a. Oksida Nitrat

NO dihasilkan oleh enzim *nitric oxide synthase* (NOS) selama proses pemecahan arginin menjadi sitrulin, dengan bantuan keluarga enzim NADPH (Drew & Leeuwenburgh, 2002: 66–81). Meskipun NO tidak memiliki muatan dan bersifat lipofilik, molekul ini tetap reaktif dengan molekul lain, seperti oksigen, radikal superoksida, dan glutathion, karena

mengandung satu elektron bebas. Interaksi ini dapat menyebabkan pembentukan zat antara reaktif, yang dapat memengaruhi fungsi protein dan seluler dalam organisme. Kelebihan produksi NO dapat menyebabkan kerusakan nitrosatif pada biomolekul (Drew & Leeuwenburgh, 2002: 66–81). Sehingga NO dapat berfungsi sebagai oksidan atau antioksidan. Selain berperan sebagai neurotransmitter dan pengatur tekanan darah, NO juga dapat menghasilkan oksidan kuat selama keadaan patologis (Salman & Ashraf, 2015: 42-49). Kelebihan produksi NO berhubungan dengan terjadinya inflamasi neurodegeneratif dan kronis, seperti rheumatoid arthritis dan penyakit inflamasi lainnya (Barbusinki, 2009: 309–314).

b. Peroksida Nitrit

Nitrit Oksida (NO) beraksi dengan O_2^- pada konstanta laju tinggi menghasilkan peroksinitrit ($O_2^- + NO \rightarrow OONO^-$) (Ozcan & Ogun, 2015), yang dapat terurai secara spontan membentuk NO_2 dan radikal hidroksil (OH). Pada pH fisiologis, $ONOO^-$ merupakan oksidan yang lebih kuat daripada O_2^- atau NO karena dapat mengoksidasi lipid, protein, asam amino nitrasi, dan DNA (Lee, dkk., 2004: 21–33). Peroxynitrite menunjukkan sifat sitotoksik yang dapat menyebabkan cedera jaringan dan mengoksidasi lipoprotein densitas rendah. Pentingnya $ONOO^-$ sebagai oksidan biologis disebabkan karena kemampuannya yang tinggi untuk berdifusi melintasi membran sel. $ONOO^-$ adalah spesies perusak jaringan penting yang diproduksi di tempat inflamasi dan terlibat dalam perkembangan berbagai gangguan neurodegeneratif dan beberapa penyakit ginjal. Molekul ini dapat menyebabkan oksidasi protein langsung dan oksidasi serta modifikasi basa DNA, bertindak sebagai oksidan yang mirip radikal hidroksil. Nitrotirosin, yang dapat dibentuk dari reaksi yang dimediasi peroksinitrit dengan jaringan yang berkaitan dengan usia, merupakan salah satu produk dari proses ini (Lee, dkk., 2004: 21–33).

Peroksinitrit juga berfungsi sebagai biomarker penting perkembangan penyakit kanker dalam kaitannya dengan inflamasi, dan produk yang dibentuk oleh reaksi antara anion radikal NO dan superoksida dapat menyebabkan kerusakan DNA dengan memproduksi 8-nitroguanin. Oleh karena itu, peroksinitrit terlibat dalam inisiasi karsinogenesis yang disebabkan oleh inflamasi (Salman & Ashraf, 2013: 42–49).

c. Nitrogen Dioksida

Nitrogen dioksida (NO_2) ada akibat dari reaksi radikal peroksil dan NO. NO_2 menginisiasi peroksidasi lipid untuk produksi radikal bebas dan juga mengoksidasi asam askorbat (Lee, dkk., 2004: 21–33). NO_2 adalah produk dekomposisi utama dari NO dan oksidan yang sangat reaktif, serta dapat mengoksidasi tirosin menjadi 3-nitrotyrosine. Selain itu, NO_2 ialah substrat untuk peroksidase. Hal ini memberikan jalur tambahan yang dapat berkontribusi pada toksisitas sel atau respons pertahanan inang yang terkait dengan peningkatan produksi NO, serta memberikan jalur alternatif untuk pembentukan 3-nitrotyrosine (Drew & Leeuwenburgh, 2002: 66–81).

F. Stres Oksidatif

Stres oksidatif terjadi ketika jumlah radikal bebas atau oksidan yang dihasilkan oleh tubuh melebihi jumlah antioksidan atau antiradikal bebas yang dihasilkan oleh tubuh itu sendiri. Ketidakseimbangan ini dapat menyebabkan radikal bebas tidak bisa diatasi oleh tubuh. Jika kelebihan radikal bebas tidak ditangkap oleh antioksidan endogen, maka reaksi oksidasi dalam sel-sel normal dalam tubuh akan meningkat, dan semakin merusak jaringan sel. Stres oksidatif dapat terjadi karena produksi ROS yang berlebihan. Untuk mengatasi hal ini, diperlukan solusi yang tepat yaitu dengan mengurangi paparan radikal bebas dan meningkatkan pertahanan tubuh melalui aktivitas antioksidan yang optimal (antioksidan eksogen) yang dapat diperoleh

dari makanan atau minuman yang dikonsumsi.

Faktor lain yang dapat menyebabkan stres oksidatif yaitu aktivitas tubuh yang berlebihan, asap rokok, radiasi, dan pencemaran udara. Kondisi semacam ini dapat memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti Interleukin-6 (IL-6) atau Tumor Nekrosis Faktor- α (TNF- α) dan memicu pelepasan PMN (polimorfonuklear). PMN atau polimorfonuklear tersebut nantinya akan menghasilkan radikal bebas seperti hydroxyl radical, superoksida anion, nitrous oxide, dan hydrogen peroxide yang dapat merusak jaringan sel seperti gingiva, ligament periodontal dan dikenal dengan istilah stres oksidatif.

Radikal bebas memiliki fungsi penting yaitu untuk menjaga kesehatan tubuh dan melakukan beberapa tugas seperti membunuh bakteri, mengatasi peradangan, serta mengontrol tonus otot polos pada pembuluh darah dan organ dalam tubuh kita. Namun, apabila jumlah radikal bebas melebihi kapasitas antioksidan yang ada di dalam sel, maka radikal bebas tersebut bisa berbalik menyerang sel itu sendiri (Sauriasari, 2006: 183-187).

Beberapa jenis antioksidan dianjurkan untuk dikonsumsi sebagai upaya untuk mengurangi radikal bebas, yaitu (Slaga & Thomas, 2005):

1. Tidak merokok atau memberi izin orang lain merokok di dekat kita. Rokok mengandung nikotin yang merupakan bahan pembentuk radikal bebas. Asap dari rokok dan produk tembakau lainnya mengandung 4000 bahan kimia serta gas berbahaya lainnya, termasuk benzene, heterosiklik amina, poliakrilik aromatik hidrokarbon, nitrosamine, elemen radioaktif, karbon monoksida, dan promotor tumor serta bahan karsinogen lainnya. Zat nitrosamine yang terdapat dalam asap rokok merupakan agen karsinogen yang paling berbahaya.
2. Menghindari radiasi sinar matahari langsung dan terpapar radiasi sinar-X yang berlebihan. Hal tersebut dapat menjadi sumber utama radikal bebas yang merusak DNA dan menimbulkan

- masalah kesehatan seperti kanker kulit dan penuaan dini, terutama pada jam-jam tertentu seperti antara pukul 10 pagi dan 3 sore.
3. Menghindari mengonsumsi daging yang diasap, dibakar, atau digoreng dengan minyak secara berulang-ulang. Daging yang diasap, dibakar, atau digoreng tersebut mengandung banyak zat karsinogen terutama nitrosamine, PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*), dan heterosiklik.
 4. Menghindari makanan yang diawetkan, karena di dalamnya terdapat nitrosamine yang dapat terbentuk dalam kondisi di mana nitrit, pengawet makanan, dikonsumsi bersama makanan yang mengandung amina atau obat-obatan tertentu, dalam kondisi asam di lambung.
 5. Melindungi atau menjaga rumah agar terhindar dari polusi udara. Sirkulasi udara dalam ruangan dapat memengaruhi tubuh manusia setiap hari, tetapi sering kali diabaikan. Oleh karena itu, penting untuk menyediakan ventilasi yang baik untuk memastikan sirkulasi udara yang lancar.

Tubuh manusia secara rutin memproduksi radikal bebas yang merupakan produk samping dari proses metabolisme normal dalam tubuh. Dalam kondisi normal, pembentukan radikal bebas diikuti oleh pembentukan antioksidan yang menciptakan keseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan. Namun, polusi, rokok, radiasi ultra violet, diet tidak sehat, makanan berlemak tinggi, bahan aditif makanan, dan faktor-faktor lainnya yang tanpa disadari masuk ke dalam tubuh dapat menyebabkan laju peningkatan produksi radikal bebas semakin cepat.

Kurangnya antioksidan dan tingginya kadar radikal bebas dapat memicu terjadinya stres oksidatif dalam tubuh. Hal ini bisa terjadi karena dua kondisi umum, yaitu produksi radikal bebas yang berlebihan atau kekurangan antioksidan. Jika terjadi stres oksidatif, maka akan terjadi kerusakan oksidatif pada tingkat sel, jaringan, dan

organ tubuh, yang pada akhirnya akan mempercepat proses penuaan dan munculnya penyakit.

Langkah dan solusi yang paling tepat untuk mengurangi stres oksidatif ialah dengan mengurangi paparan radikal bebas dan meningkatkan pertahanan tubuh melalui konsumsi antioksidan. Meskipun sulit untuk menghindari radikal bebas sepenuhnya, tetapi dengan mengurangi paparannya dan meningkatkan asupan antioksidan, kita dapat meningkatkan kualitas hidup yang lebih sehat.

Dewasa ini, terdapat banyak perhatian terhadap radikal bebas. Radikal bebas berupa ROS dan RNS dihasilkan oleh tubuh manusia dengan berbagai sistem endogen yang berperan, kondisi paparan fisiokimia, dan keadaan patologis yang berbeda. Artinya, keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas di dalam tubuh sangat diperlukan sebagai fungsi fisiologis yang tepat. Jika radikal bebas mendominasi kemampuan tubuh untuk mengatur regulasinya, maka timbul suatu kondisi yang dikenal sebagai stres oksidatif. Dampak negatif radikal bebas dapat mengubah lipid, protein, dan DNA yang kemudian memicu sejumlah penyakit manusia. Oleh karena itu, penerapan sumber antioksidan eksternal (antioksidan eksogen) dapat membantu dalam menangani stres oksidatif yang terjadi ini. Pencarian senyawa alami yang efektif dan tidak beracun (toksik) dengan aktivitas antioksidan telah diintensifkan dalam beberapa tahun terakhir. Tinjauan ini memberikan gambaran singkat tentang stres oksidatif akibat kerusakan sel dan peran antioksidan pada sumber makanan sebagai makanan fungsional dalam mengatasi penyakit manusia.

Maka, hingga saat ini masih terus berlanjut penelitian yang berfokus pada uji dan pencarian antioksidan eksogen, khususnya yang berasal dari antioksidan alami, sebagai upaya menjaga keseimbangan produksi antioksidan dan radikal bebas dengan atau tanpa efek negatif yang ditimbulkan dari asupan antioksidan eksogen tersebut.

Bab 3

Analisis Antioksidan secara *In Vitro*

Antioksidan adalah senyawa yang menjadi bagian penting dari kehidupan. Antioksidan membantu menetralkan, menyeimbangkan, dan menghilangkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) atau radikal bebas lain yang dapat merusak senyawa-senyawa penting dalam tubuh. Terdapat berbagai metode analisis secara *in vitro* untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan baik sebagai senyawa murni maupun yang diperoleh dari ekstrak tumbuhan. Beberapa metode tersebut ialah HAT (*Hydrogen Atom Transfer*), ET (*Electron Transfer*), dan metode pengujian (*assay*) lain, seperti CAA (*Cellular Antioxidant-capacity Assay*), TLC Bioautography, Chemiluminescence/Photochemiluminescence, Enhanced Chemiluminescence. Metode-metode ini memiliki prinsip yang berbeda, dan masing-masing metode ini dapat dikelompokkan berdasarkan bahan, tujuan, dan prinsip kerjanya.

Oksidasi yang disebabkan oleh ROS dapat mengakibatkan disintegrasi membran sel. Kerusakan protein membran dari mutasi DNA yang memainkan peran penting dalam proses penuaan (*aging*) selanjutnya dapat menginisiasi dan menyebabkan perkembangan

banyak penyakit lain, seperti arteriosclerosis, kanker, diabetes mellitus, kerusakan hati (*liver injury*), kerusakan kulit (*skin damage*), penyakit jantung koroner, dan radang sendi.

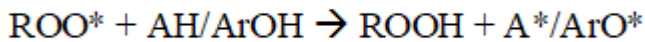
Ketika membahas mengenai metode pengujian aktivitas antioksidan dan menentukan metode yang tepat untuk menguji aktivitas suatu antioksidan, sebaiknya peneliti terlebih dahulu mengenali karakteristik dari sampel uji antioksidan tersebut. Peneliti secara spesifik harus mengetahui spesifikasi oksidan itu sendiri apakah tergolong dalam *peroxy radical scavenging capacity*, *superoxide scavenging capacity*, atau *ferric ion reducing capacity* (Salunkhe, dkk., 1995).

Metode pengujian didasarkan atas reaksi kimia yang terlibat, dapat dibagi menjadi HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) dan ET (*Electron Transfer*). Tes atau uji dengan metode ET melibatkan reaksi redoks dengan oksidan sebagai indikator titik akhir reaksi. Sementara kebanyakan tes atau uji dengan metode HAT memantau kinetika reaksi kompetitif dan kuantifikasi dari kurva kinetik. Metode HAT umumnya terdiri dari generator radikal bebas sintesis, *probe* molekuler yang dapat dioksidasi, dan antioksidan. Uji dengan metode HAT dan ET digunakan untuk mengukur kapasitas penangkapan radikal atau oksidan (Huang, dkk., 2005: 1841–1856).

Aktivitas antioksidan tidak bisa disimpulkan hanya berdasarkan satu model pengujian saja. Dalam praktiknya, terdapat beberapa metode analisis antioksidan secara *in vitro* yang prosedurnya dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan. Model metode uji bervariasi, sehingga sulit membandingkan sepenuhnya antara satu metode dengan metode lain. Peneliti harus secara kritis memverifikasi metode analisis antioksidan sebelum mengadopsi dan menerapkan dalam kegiatan laboratorium untuk tujuan penelitiannya. Umumnya, terdapat 3 metode analisis antioksidan secara *in vitro* (Badarinath, dkk., 2010: 1276–1285).

A. HAT (*Hydrogen Atom Transfer*)

Hydrogen Atom Transfer (HAT) merupakan tes/uji aktivitas antioksidan melalui eliminasi radikal bebas (yang dapat berupa radikal peroksil) dengan mendonasikan/mentransfer atom H. Mekanisme HAT pada aktivitas antioksidan di mana atom H dari fenol (Ar-OH) ditransfer ke radikal ROO*, dapat digambarkan menjadi reaksi sebagai berikut:



Pada reaksi ini, *aryloxy radical* atau radikal ariloksi (ArO*) yang terbentuk dari reaksi antioksidan fenol dengan radikal peroksil dapat distabilkan oleh resonansi. Spesies AH dan ArOH masing-masing menunjukkan biomolekul dan antioksidan yang dilindungi atau dipertahankan. Antioksidan fenolik efektif harus bereaksi lebih cepat dibanding reaksi antara radikal bebas dengan biomolekul, untuk memproteksi terjadinya oksidasi.

Karena dalam metode uji aktivitas antioksidan HAT ini menggunakan *probe* fluoresen dan reaksi antioksidan dengan ROO, maka aktivitas antioksidannya dapat ditentukan dari kompetisi kinetik dengan mengukur kurva penurunan *probe* fluoresensi ada tidaknya antioksidan dan mengintegrasikan area di bawah kurva. Sebagai contoh, uji antioksidan berbasis HAT ini meliputi ORAC, TRAP, *crocin bleaching assay*, dan lain sebagainya. Berikut adalah penjelasan lebih lanjut mengenai metode uji tersebut:

1. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity Method*)

Metode ORAC atau ORAC *assay* merupakan salah satu metode untuk menentukan kapasitas antioksidan. ORAC adalah sebuah metode analisis yang dinilai menarik dan revolusioner yang dapat menguji besaran antioksidan pada makanan maupun zat kimia lainnya. Metode

uji ORAC menyediakan sumber radikal peroksil yang dapat dikontrol yang memodelkan reaksi antioksidan dengan lipid dalam makanan dan dapat diadopsi untuk mendeteksi antioksidan hidrofilik dan hidrofobik dengan mengubah sumber radikal dan pelarut. Selama ini, metode uji ORAC banyak digunakan pada sampel makanan dan banyak industri nutrasetikal yang menggunakan metode uji ORAC ini.

Metode uji ini dapat dilakukan dengan menggunakan b-PE (b-PhycoErythrin) yang akan fluoresensi sebagai molekul target. Metode uji ini menggunakan Trolox (sebuah analog vitamin E yang larut dalam air) sebagai baku untuk menghitung TE (*Trolox Equivalent*). Nilai ORAC dinyatakan sebagai unit atau ORAC *value*. Nilai ORAC *value* yang semakin besar menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi.

Prinsip pengujian: Prinsip uji ini didasarkan pada penghambatan radikal peroksil oksidasi yang diinduksi dan diinisiasi oleh termal dekomposisi dari senyawa azo seperti AAPH (Glazer, 1990: 161–168). Metode uji ini mengukur hilangnya fluoresensi. Fluoresensi dalam waktu yang berlebih menyebabkan pembentukan radikal peroksil akibat kerusakan inisiator bis azida, AAPH (2,2-azobis-amidopropana, dehidroklorida) pada suhu 37°C.

Berkurangnya fluoresensi dapat dilihat dan aktivitas antioksidan dapat ditentukan dengan keterlambatan proses hilangnya fluoresensi. Pada metode ORAC, b-fikoeritrin (b-PE) digunakan sebagai target kerusakan radikal bebas, AAPH sebagai radikal peroksi generator, dan Trolox sebagai control standar. Setelah penambahan AAPH ke larutan uji, fluoresensi dicatat, dan aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai TE (*Trolox Equivalent*) (Prior, dkk., 2003: 3273–3279).

Sinyal fluoresensi diukur setelah lebih kurang 30 menit dengan panjang gelombang eksitasi 485 nm, panjang gelombang emisi 538 nm, dan batas 530 nm. Antioksidan menghambat oksidasi fluoresensi dengan transfer atom hidrogen. Metode ORAC dikembangkan menggunakan protein fluoresen-fikoeritrin sebagai target radikal yang kemudian

digantikan oleh fluoresensi karena inkonsistensi, sensitivitas cahaya, dan masalah dengan pengikatan polifenol.

Prosedur pengujian dilakukan sebagai berikut:

- a. Pengujian dilakukan dalam *well plate* fluoresensi polypropylene dengan 96-well atau 96 sumuran dan dengan volume akhir 200 μL .
- b. Pengujian dilakukan pada pH 7,0 dengan Trolox (6,25; 12,5; 25; dan 50 $\mu\text{mol/L}$) untuk uji lipofilik, dan Trolox (12,5; 25; 50; dan 100 $\mu\text{mol/L}$) untuk uji hidrofilik sebagai standar dan 75 mM/L buffer fosfat sebagai blanko.
- c. Setelah penambahan dari AAPH, *well-plate* ditempatkan pada multilabel counter hingga 37°C. Well-plate diletakkan pada shaker dengan gerakan orbital selama 10 detik dan fluoresensi dibaca pada interval 1 menit sampai 35 menit pada panjang gelombang eksitasi 485 nm dan panjang gelombang emisi 520 nm.
- d. Area di bawah kurva dihitung untuk setiap sampel menggunakan software Wallac-Workout 1.5. Perhitungan akhir dari hasil dibuat dengan mengambil perbedaan area bawah penurunan kurva antara blanko dan sampel dan atau standar (*Trolox Equivalent*) yang kemudian dinyatakan dalam $\mu\text{M TE}$ per gram berat kering sampel ($\mu\text{M TE/g}$).

2. Metode TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter Method*)

Metode ini menggunakan R-phycoerythrin (R-PE) sebagai probe fluoresen. Laju reaksi R-PE dengan AAPH dipantau secara fluorometrik dengan panjang gelombang eksitasi 495 nm dan panjang gelombang emisi 575 nm. R-PE adalah pewarna fluoresen paling terang yang pernah diteliti, yang awalnya diisolasi dari ganggang merah *Gracilaria*. Nilai TRAP dihitung dari panjang *lag phase* yang disebabkan antioksidan dibandingkan dengan Trolox. Luminol juga dapat digunakan sebagai zat *chemiluminescent*.

Metode ini didasarkan pada perlindungan yang diberikan oleh antioksidan pada peluruhan fluoresensi R-phycoerythrin (R-PE) selama reaksi peroksidasi terkontrol. Fluoresensi R-phycoerythrin dipadamkan oleh ABAP (2,2'-azo-bis(2-amidino-propana)hidroklorida) sebagai generator radikal. Reaksi pendinginan ini diukur dengan adanya antioksidan. Potensi antioksidan dievaluasi dengan mengukur peluruhan dalam penghilangan warna (dekolorisasi). Menurut (Ghiselli, dkk., 1995: 29–36), 120 μL larutan sampel ditambahkan ke 2,4 mL buffer fosfat (pH 7,4); 375 μL akuades; larutan R-PE dan 75 μL ABAP, kinetika reaksi dicatat pada 38°C selama 45 menit dengan spektrometer luminescence. Nilai TRAP dihitung dari panjang *lag phase* berdasar pada sampel yang dibandingkan dengan larutan standar.

Luminol-enhanced chemiluminescence (CL) digunakan untuk menindaklanjuti reaksi radikal peroksid. Sinyal CL didorong oleh produksi radikal turunan luminol dari dekomposisi termal AAPH. Nilai TRAP ditentukan dari durasi periode waktu (*T sample*) selama sampel memadamkan sinyal CL karena adanya antioksidan. Jumlah yang diketahui (8,0 nM) dari trolox, analog yang larut dalam air dari tokoferol digunakan sebagai inhibitor referensi (Trolox), sebagai pengganti sampel. Menurut (Pisoschi, 2011: 1), tidak mungkin untuk mendeteksi kapasitas antioksidan polifenol yang sama atau kurang dari 35 mg per 100 g berat segar.

3. ABTS radical scavenging method/TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) decolorization

Metode uji ABTS *radical scavenging* juga dikenal sebagai TEAC (*Trolox Antioxidant Capacity*) *decolorization*. Kromofor kationik radikal stabil hijau-biru, 2,2'-azinobis-3-ethylbenzoithiazoline-6-sulfonate (ABTS⁺) diproduksi oleh oksidasi dan memiliki serapan atau absorbansi pada panjang gelombang 414, 734, dan 815 nm. Dalam pengujian ABTS *radical scavenging method* membutuhkan 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-

sulphonic acid) yang pada perlakuan dengan natrium/kalium persulfate (Re, dkk., 1999: 1231–1237) atau MnO_2 (RiceEvans, dkk., 1995: 375–383) menghasilkan kation radikal hijau kebiruan (ABTS⁺). Kation radikal diperoleh dengan mereaksikan stok ABTS 7 mM dengan kalium persulfate 2,45 mM kemudian mendiamkan campuran dalam bejana gelap selama 12-16 jam sebelum digunakan. Kation radikal berkurang dengan adanya hidrogen yang menyumbangkan antioksidan (baik senyawa lipofilik, hidrofilik dan ekstrak makanan termasuk flavonoid, hidroksisinamat, serta karotenoid).

Kation radikal menunjukkan serapan maksimal pada panjang gelombang 415 nm, 645 nm, 734 nm, dan 815 nm. Trolox dapat digunakan sebagai antioksidan standar. Pengaruh konsentrasi antioksidan dan durasi reaksi terhadap penghambatan penyerapan kation radikal dapat dihitung ketika menentukan aktivitas antioksidan. Metode ini lebih baik daripada TEAC-I (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay*) yang menggunakan metmyoglobin- H_2O_2 untuk menghasilkan HO, yang kemudian direaksikan dengan ABTS untuk menghasilkan kation radikal.

Kation radikal ABTS⁺ berwarna biru dan menyerap cahaya pada panjang gelombang 734 nm. Ketika zat makanan diuji menggunakan uji ini, profil kinetik harus diperiksa terlebih dahulu sebelum titik akhir ditentukan (Walker & Richard, 2009: 1156–1161). Kation radikal ABTS reaktif terhadap sebagian besar antioksidan termasuk fenolat, tiol dan vitamin C (Walker & Richard, 2009: 1156–1161). Selama reaksi ini, kation radikal ABTS yang berwarna biru diubah menjadi bentuk netral yang tidak berwarna. Reaksi dapat dipantau secara spektrofotometri. Reaksi dapat selesai dalam 4 menit hingga beberapa jam. Uji ini sering disebut sebagai *Trolox equivalent antioxidant capacity* (TEAC-II) assay. Reaktivitas dari bermacam-macam antioksidan yang diuji dibandingkan dengan Trolox, suatu analog vitamin E yang larut dalam air. Kelemahan dari pengujian berbasis ABTS adalah banyaknya reaksi ABRS yang merupakan radikal bebas non fisiologis.

ABTS *radical scavenging method* menggunakan spektrofotometer dioda-array yang akan mengukur berkurangnya warna ketika suatu antioksidan ditambahkan ke ABTS⁺ (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonat acid)) suatu kromofor biru-hijau. Antioksidan mereduksi ABTS⁺ menjadi ABTS dan menghilangkan warna. ABTS⁺ adalah radikal stabil yang tidak ditemukan di dalam tubuh manusia. Aktivitas antioksidan dapat diukur seperti yang dijelaskan oleh (Seeram, dkk., 2006: 1599–1603). Kation radikal ABTS dibuat dengan menambahkan mangan oksida padat (80 mg) ke dalam larutan stok cair ABTS 5 mM (20 mL menggunakan buffer 75 mM Na/K pH 7). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic acid), analog vitamin E yang larut dalam air, dapat digunakan sebagai standar antioksidan. Kurva kalibrasi standar dibuat untuk Trolox pada konsentrasi 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, dan 350 μ M. Sampel diencerkan dengan tepat sesuai dengan aktivitas antioksidan dalam buffer Na/K pH 7. Sampel yang diencerkan kemudian dicampur dengan 200 μ L larutan kation radikal ABTS⁺ dalam 96 sumuran (*well-plates*). Dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 750 nm setelah 5 menit dalam *microplate reader*. Nilai ABTS dapat dihitung dari kurva standar Trolox dan dinyatakan sebagai *trolox equivalent* (dalam mM).

Substrat prooksidase 2,2,-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), membentuk radikal yang relatif stabil pada oksidasi satu elektron, dan telah menjadi substrat yang populer untuk estimasi kapasitas antioksidan total. Uji kinetik, termasuk TAS (*Total Antioxidant Status*) assay (produk komersialnya Randox), didasarkan pada penghambatan pembentukan ABTS oksidan elektron satu per satu. Pendekatan yang sederhananya dan lebih sering digunakan/diterapkan adalah dekolorisasi ABTS yang dibentuk sebelumnya. Kelemahan yang jelas dari tes berbasis ABTS adalah reaksi bebas dari reaksi ABTS⁺ yang merupakan radikal bebas non fisiologis.

4. *Crocin Bleaching Nitric Oxide Radical Inhibition Assay*

Crocin ($C_{44}H_{64}O_{24}$) adalah karotenoid alami yang diperoleh dari saffron (*Crocus sativus* L.). *Crocin Bleaching Assay* (CBA) disarankan oleh (Bors & Michel, 1984: 312–319) sebagai metode yang cocok untuk skrining aktivitas pembersihan radikal (*radical scavenging*). Awalnya, penghambatan *crocin bleaching* oleh berbagai zat dipantau oleh kinetika kompetisi dengan adanya radikal alkoxyl yang dihasilkan secara fotolitik. Dalam CBA, abstraksi atom hidrogen dan atau penambahan radikal ke struktur poliena crocin akan menimbulkan gangguan pada sistem terkonjugasi dan menyebabkan *crocin bleaching*. Yang terakhir dicatat sebagai pengurangan absorbansi pada panjang gelombang 440 nm dengan ada atau tidak adanya *radical scavengers*.

Aktivitas prooksidan diambil sebagai rasio penurunan absorbansi crocin pada menit ke 5 dan konsentrasi yang relevan (Alamdari DH, dkk., 2009: 158-166; Manzocco & Sonia, 2002: 2767-2771). Kemudian, Bors & Michel, (1984: 312–319) menemukan bahwa tingkat absolut *crocin bleaching* sangat bergantung pada jenis radikal yang menyerang struktur poliena. Kemudian, pembentukan radikal peroksil dicapai dengan menggunakan azo-inisiator (hidrofilik atau lipofilik) (Notas, dkk., 2005: 4194–4198). Dengan cara ini, Tubaro & Micossi (1996: 173–179) berusaha untuk merata-rata efek antioksidan dan prooksidan dari konstituen campuran alami yang kompleks. Hasil dinyatakan dengan mengacu pada alfa-tokoferol (untuk molekul lipofilik) atau Trolox (untuk molekul hidrofilik).

5. *Hydroxyl radical scavenging activity by p-butylsulfonethyl aniline*

Radikal hidroksil adalah salah satu spesies oksigen reaktif yang memiliki potensi dalam sistem biologis yang bereaksi dengan bagian asam lemak tak jenuh ganda dari fosfolipid membran sel dan menyebabkan kerusakan sel (Halliwell, 1981: 347–352). Kemampuan menangkap

radikal hidroksil diukur dengan metode (Kuchandy & Rao, 1990: 237–240). Campuran reaksi (1,0 mL) terdiri dari 100 μL 2-deoksi-Dribosa (28 mM dalam 20 mM KH_2PO_4 -KOH, pH 7,4), 500 μL ekstrak, 200 μL EDTA (1,04 mM) dan 200 μM FeCl_3 (1:1 v/v), 100 μL H_2O_2 (1,0 mM) dan 100 μL asam askorbat (1,0 mM) yang diinkubasi pada 37°C selama 1 jam. Satu milliliter asam tiobarbiturat (1%) dan 1,0 mL asam trikloroasetat (2,8 %) ditambahkan dan diinkubasi pada 100°C selama 20 menit. Setelah pendinginan, absorbansi diukur pada 532 nm terhadap sampel kosong. Asam galat, manitol, katekin (Kuchandy & Rao, 1990: 237–240), vitamin E (Halliwell & Gutteridge, 1987: 215–219), quercetin, BHA, alfa-tokoferol (Klein & Cohen, 1981: 6006–6012), dan asam askorbat (Jayaprakasha & Rao, 2004: 5141–5146) dapat digunakan sebagai kontrol positif.

6. Scavenging of H_2O_2 radical (Hydrogen Peroxide Scavenging Assay)

Manusia terpapar H_2O_2 (hidrogen peroksida) secara tidak langsung melalui lingkungan hampir sekitar 0,28 mg/kg/hari dengan asupan sebagian besar dari daun suatu tanaman. Hidrogen peroksida dapat masuk ke dalam tubuh manusia melalui uap yang terhirup, asap atau kabut, dan melalui kontak mata atau kulit. H_2O_2 dengan cepat terurai menjadi oksigen dan air dan ini dapat menghasilkan radikal hidroksil (*OH) yang dapat menginisiasi peroksidasi lipid dan menyebabkan kerusakan DNA dalam tubuh. Berdasarkan metode (Ruch, dkk., 1989: 1003–1008), kemampuan ekstrak tumbuhan untuk melakukan *scavenging* radikal hidrogen peroksida adalah sebagai berikut: Larutan hidrogen peroksida (40 mM) dilarutkan dalam buffer fosfat (50 mM pH 7,4). Konsentrasi hidrogen peroksida ditentukan dengan absorbansi pada panjang gelombang 230 nm, yang ditentukan setelah 10 menit terhadap blanko (buffer fosfat tanpa hidrogen peroksida). Persentase *scavenging* hidrogen peroksida dihitung sebagai berikut:

$$\% \text{ scavenged } (\text{H}_2\text{O}_2) = A/B \times 100$$

A adalah absorbansi sampel dan B adalah absorbansi kontrol. Asam askorbat (Jayaprakasha & Rao, 2004: 5141–5146), BHA, alfa-tokoferol, atau quercetin (Ruch, dkk., 1989: 1003–1008) dapat digunakan sebagai kontrol positif.

7. HORAC (*hydroxyl radical averting capacity*)

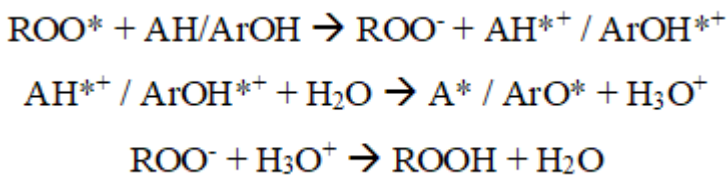
Radikal hidroksil dihasilkan oleh reaksi mirip Fenton yang dimediasi CO^{2+} dan pembentukan radikal hidroksil saat keadaan eksperimental secara tidak langsung dikonfirmasi oleh hidroksilasi asam p-hidroksibenzoat. Kurva peluruhan fluoresensi dipantau tanpa adanya antioksidan yang merupakan indeks kapasitas pencegahan radikal hidroksil. Asam galat dipilih sebagai standar referensi dan aktivitas diukur dalam persamaan asam galat/*Gallic Acid Equivalents* (GAE). Kapasitas pencegahan radikal hidroksil terutama disebabkan oleh kemampuan pengkkelatan logam dari senyawa (Ou, dkk., 2002: 2772–2777).

Uji HORAC dijelaskan oleh (Ou et 2002), yang mengukur aktivitas pengkkelat logam antioksidan dalam kondisi reaksi mirip Fenton menggunakan kompleks Co(II) dan dengan itu memiliki kemampuan melindungi terhadap pembentukan radikal hidroksil. Larutan hidrogen peroksidan 0,55 M dibuat dalam aquades dan 4,6 mM Co(II) dibuat dengan melarutkan 15,7 mg $\text{CoF}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan 20 mg asam pikolinat dalam 20 mL aquades. Fluoresecein – 170 μL (60 nM, konsentrasi akhir) dan 10 μL sampel diinkubasi pada 37°C selama 10 menit dan langsung dibaca. Setelah inkubasi, 10 μL H_2O_2 (27,5 mM, konsentrasi akhir) dan 10 μL Co(II) (konsentrasi akhir, 230 μM) ditambahkan kemudian. Fluoresence awal diukur setelah pembacaan dilakukan setiap menit setelah *shaking*. Untuk sampel blanko, digunakan larutan buffer fosfat. 100, 200, 600, 800, dan 1000 μM larutan antioksidan standar (dalam buffer fosfat 75 mM, pH 7,4) digunakan untuk membangun

kurva standar. Nilai HORAC akhir dihitung menggunakan persamaan regresi antara konsentrasi antioksidan standar dan luas di bawah kurva. Satu unit HORAC ditetapkan ke *protection area* yang disediakan oleh antioksidan standar 1 μM dan aktivitas sampel dinyatakan sebagai ekuivalen antioksidan standar 1 μM per gram berat segar sampel. Asam galat dapat digunakan sebagai antioksidan standar.

B. ET (Electron Transfer)

Mekanisme aksi antioksidan ET (*Electron Transfer*) didasarkan pada reaksi:



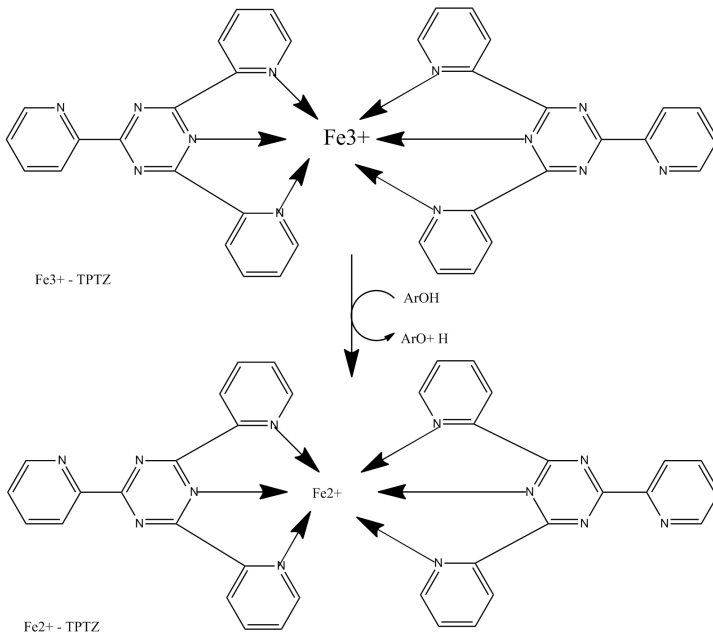
Reaksi tersebut relatif lebih lambat dibandingkan dengan metode analisis antioksidan HAT dan bergantung pada pelarut serta pH. Sebagian besar pengujian berbasis metode analisis antioksidan ET, aksi antioksidan disimulasikan dengan *probe* potensial redoks yang sesuai, yaitu antioksidan bereaksi dengan *probe* fluoresen atau berwarna (zat pengoksidasi) seperti peroksil radikal. Pengujian aktivitas antioksidan berbasis ET dilakukan menggunakan spektrofotometri dan mengukur kapasitas antioksidan dalam reduksi oksidan, yang berubah warna saat direduksi.

Tingkat perubahan warna (baik peningkatan maupun penurunan absorbansi pada panjang gelombang tertentu) berkorelasi dengan konsentrasi antioksidan dalam sampel. ABTS/TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) dan DPPH termasuk dalam uji dekolourisasi. Sedangkan dalam uji total fenol Folin, FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), dan CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*), terjadi peningkatan absorbansi pada panjang gelombang sebagaimana

antioksidan bereaksi dengan reagen kromogenik (Apak, dkk., 2007: 1496–1547).

1. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Uji FRAP pada awalnya dikembangkan oleh Benzi dan Strain untuk mengukur daya reduksi dalam plasma, tetapi pengujian selanjutnya juga telah diadaptasi dan digunakan untuk pengujian antioksidan dalam tumbuhan. Uji FRAP menggunakan antioksidan sebagai reduktor dalam metode kolorimetri yang berkaitan dengan reaksi redoks, serta menggunakan sistem oksidan yang mudah tereduksi pada keadaan stoikiometri. Pada pH rendah (3,6), reduksi kompleks ferric tripyridyl triazine (Fe^{3+} - TPTZ) menjadi bentuk ferrous (yang berwarna biru intens) dapat dipantau dengan mengukur perubahan serapan pada panjang gelombang 593 nm, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Reduksi Fe^{3+} - TPTZ menjadi Fe^{2+} - TPTZ

Reaksinya tidak spesifik, yang mana setiap setengah reaksi yang memiliki potensial redoks lebih rendah, di bawah kondisi reaksi, setengah reaksi Fe, akan mendorong pembentukan ion besi (Fe^{3+} ke Fe^{2+}) (potensial redoks 0,77 V). Oleh karena itu, perubahan absorbansi secara langsung berhubungan dengan gabungan atau total daya reduksi dari antioksidan pendonor elektron yang ada dalam campuran reaksi. Larutan standar besi sulfat (FeSO^4) digunakan untuk kalibrasi, sebagai larutan referensi. Kapasitas antioksidan berdasarkan kemampuan mereduksi ion besi sampel dihitung dari kurva kalibrasi linier dan dinyatakan sebagai ekuivalen mmol FeSO per gram sampel. BHT, BHA, asam askorbat, quercetin, catechin atau trolox (Benzie, 1996: 70–76) dapat digunakan sebagai kontrol positif.

Uji FRAP melibatkan reaksi FRAP yang dibuat dengan mencampurkan TPTZ (2,5 mL, 10 mM dalam 40 mM HCl), 25 mL buffer asetat dan 2,5 mL $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM). Larutan akhir mengandung 1,67 mM Fe^{3+} dan 0,83 mM TPTZ. Untuk mengukur nilai FRAP, 300 μL reagen FRAP yang baru disiapkan, dihangatkan hingga 37°C dan pembacaan blanko reagen dilakukan pada 593 nm menggunakan spektrofotometer diode-array; kemudian 10 L sampel dan 30 L air ditambahkan. Pembacaan absorbansi dilakukan setelah 0,5 detik dan setiap 15 detik, hingga 4 menit. Nilai FRAP dinyatakan dalam mg ekuivalen asam askorbat /gr sampel (mg AAE/g). Pada pengujian ini digunakan asam askorbat (vitamin C) sebagai pembanding (Muslikha, 2020; Zitane, 2017: 533–550).

2. 1,1-diphenyl-porylhydrazil (DPPH) *free radical scavenging assay*

Metode modifikasi aktivitas pemulungan DPPH ini telah banyak digunakan sebagai pengujian awal antioksidan suatu senyawa. Pada 96 sumuran (*well-plate*) yang berisi 50 μL sampel pada berbagai konsentrasi ditambahkan 200 μL 0,077 mmol DPPH. Sementara untuk blanko,

250 μL pelarut sampel (ddH_2O) digunakan, dan sebagai kontrol, 250 μL DPPH 0,077 mmol digunakan. *Microplate reader* dioperasikan pada panjang gelombang 517 nm yang digunakan untuk menguji absorbansi *well-plate* yang telah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan lingkungan gelap. Aktivitas DPPH *scavenging* dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Aktivitas DPPH } \textit{scavenging} (\%) = (\text{AB})/\text{A} \times 100$$

A merupakan absorbansi kontrol, dan

B merupakan absorbansi sampel.

DPPH (1,1-diphenyl-porylhydrazil) adalah radikal stabil karena distabilisasi oleh delokalisasi cincin aromatik. DPPH dapat menjebak radikal lain dengan mudah tetapi tidak mengalami dimerisasi. Karena ikatan absorpsi kuat pada panjang gelombang sekitar 515 nm, larutan DPPH *Free Radical Scavenging Assay* terbentuk dalam warna ungu tua dan menjadi tidak berwarna hingga kuning pucat bila direduksi pada reaksi dengan melibatkan donor hidrogen. Penurunan absorbansi tergantung secara linier pada konsentrasi antioksidan. Trolox dan senyawa-senyawa antioksidan dapat digunakan sebagai antioksidan standar (Abuin, 2002: 145–149).

Molekul 1,1-diphenyl-porylhydrazil (DPPH) dicirikan sebagai radikal bebas yang relatif stabil karena kemampuan delokalisasi elektron bebas pada molekul secara keseluruhan. Delokalisasi elektron juga menimbulkan warna ungu tua dengan serapan maksimum pada panjang gelombang sekitar 517 nm. Ketika larutan DPPH dicampur dengan substrat (AH) yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka akan menyebabkan berkurangnya/hilangnya warna ungu ini.

Untuk mengevaluasi potensi antioksidan melalui penangkalan (*scavenging*) radikal bebas oleh sampel uji, perubahan serapan larutan DPPH diukur menggunakan spektrofotometri (Manzocco, dkk., 1998:

694–698). Pada pengujian ekstrak sampel diencerkan/dilarutkan dengan methanol diambil sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH (0,5 mM). Setelah 30 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 517 nm. Persentase penangkapan radikal DPPH dihitung dengan menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan radikal DPPH} = ([A_{br} - A_{ar}] / A_{br}) \times 100$$

A_{br} adalah absorbansi kontrol (tanpa sampel) dan A_{ar} adalah absorbansi pada sampel setelah reaksi berlangsung.

Dalam pengujian ini, kontrol positif dapat berupa asam askorbat, asam galat, BHA, alfa-tokoferol, quercetin (Shon, dkk., 2003: 165–169), BHT (Liyana-Pathirana, 2005: 2433–2440), catechin (Astudillo, dkk., 2000: 567–573), atau glutation.

3. Copper (II) Reduction Capacity / CUPRAC Assay

Copper (II) reduction capacity/CUPRAC assay, merupakan uji kapasitas antioksidan pengurangan ion tembaga menggunakan reagen neukoroin tembaga (II) sebagai zat pengoksidasi kromogenik. Metode ini lebih menguntungkan dibandingkan pengujian berbasis ET (*Electron Transfer*) lainnya karena rentang pH untuk pengujian ini adalah pH fisiologis (7) berbeda dengan pH basa yang digunakan dalam metode Folin atau pH asam yang digunakan dalam metode FRAP. Ini berlaku untuk antioksidan hidrofilik dan lipofilik (tidak seperti tes folin dan DPPH), memiliki tindakan selektif pada senyawa antioksidan tanpa memengaruhi gula dan asam sitrat yang biasa ada dalam bahan makanan dan memiliki kapasitas untuk menguji antioksidan pembawa (-SH), tidak seperti FRAP (Apak, dkk., 2007: 1496–1547).

Metode pengujian CUPRAC menjelaskan pengembangan pengujian kapasitas antioksidan yang sederhana dan dapat diterapkan secara luas untuk flavonoid, asam fenolik, asam hidroksisinamat, tiol, antioksidan

sintetika dan vitamin C serta E (Apak, dkk., 2013: 957–998).

CUPRAC merupakan metode yang dapat untuk mengukur jumlah polifenol, flavonoid, dan kapasitas antioksidan serum plasma. Antioksidan atau ekstrak standar dicampur dengan CuSO_4 dan neokuproin. Setelah 30 menit, absorbansi diukur pada panjang gelombang 450 nm. Dalam pengujian, Cu(II) direduksi menjadi Cu(I) melalui aksi antioksidan pendonor elektron. Hasil dinyatakan dalam nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi sampel yang dapat mengurangi serapan perbandingan sebanyak 50%.

Reaksi CUPRAC selesai dalam 30 menit untuk sebagian besar sampel. Antioksidan yang bereaksi lambat mungkin memerlukan inkubasi suhu tinggi untuk menyelesaikan reaksinya dengan reagen CUPRAC. Reagen CUPRAC tidak melibatkan reagen radikal sehingga tidak sensitif terhadap sejumlah parameter fisik seperti suhu, sinar matahari, pH, kelembapan, dll. Dapat diadsorpsi pada membran penukar kation untuk membangun sensor antioksidan respons linier (Bener, 2010: 4252–4258). Metodologi CUPRAC dapat digambarkan sebagai rangkaian pengukuran mandiri dan terintegrasi yang menyediakan “*antioxidant and antiradical assay package*” yang berguna (Ozyurek, 2011: 2439–2453).

Reagen pengoksidasi kromogenik dari metode CUPRAC yang dikembangkan, yaitu bis(neokuproin) tembaga (II) klorida [Cu(II)-Nc], bereaksi dengan polifenol [Ar(OH)_n] dengan cara tersebut, di mana proton yang dibebaskan dapat disangga dengan larutan penyangga ammonium asetat yang relative pekat. Dalam reaksi ini, gugus Ar-OH reaktif dari polifenol dioksidasi menjadi kuinon yang sesuai dan Cu(II)-Nc direduksi menjadi kelat Cu(I)-Nc yang sangat berwarna yang menunjukkan penyerapan maksimum pada panjang gelombang 450 nm.



Sebelum dilakukan pengujian, terlebih dahulu disiapkan seri larutan baku, perbandingan dan sampel dengan seri konsentrasi 5, 10, 25, 50, 75

ppm. Selanjutnya, 1 ml sampel (baku, pembanding, ekstrak) ditambahkan 1 mL larutan CuCl_2 10^{-2} M, 1 mL larutan neokuproin $7,5 \times 10^{-3}$ M dan larutan $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 1 M ditambahkan ke dalam tabung reaksi kaca. Larutan yang sudah dipreparasi dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit (Apak, dkk., 2008: 413–419).

Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai IC₅₀ melalui persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi bahan uji pada sumbu x dan %inhibisi pada sumbu y. Persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk mendapatkan nilai IC₅₀ (Ramadhan, dkk., 2020: 7–12).

4. Total phenols assay by Folin-ciocalteu

Kolorimetri Folin-Ciocalteu (FC) didasarkan pada penemuan metode reduksi kimia reagen Singleton dan Rossi, yaitu campuran tungsten dan molibdenum oksida. Metode ini sensitif, kuantitatif, dan relatif tidak bergantung pada derajat polimerisasi fenol. Akan tetapi koreksi untuk protein, asam nukleat dan asam askorbat dan mungkin diperlukan untuk aksi interferensinya.

Produk reduksi oksida logam memiliki warna biru yang menunjukkan serapan maksimum pada panjang gelombang 765 nm (750 – 770 nm). Karena sebagian besar senyawa fenolik berada dalam bentuk terdisosiasi (sebagai basa konjugasi atau anion fenolat) pada pH kerja pengujian (pH~10), yang dapat lebih mudah dioksidasi dengan reagen Folin-Ciocalteu (FC).

Molibdenum dalam reagen kompleks direduksi dari Mo(VI) menjadi Mo(V) dengan elektron donor oleh antioksidan untuk menghasilkan warna biru. Intensitas penyerapan cahaya pada panjang gelombang itu sebanding dengan konsentrasi fenol dan hasilnya dinyatakan dalam asam galat ekuivalent (*Gallic Acid Equivalents*/GAE). Fenol secara stoikiometri mereduksi fosfomolibdat/asam fosfotungstat. Kromofor Folin-Ciocalteu (FC) yang merupakan fosfo-tungstomolibdat (V) bermuatan multivalent yang memiliki afinitas besar terhadap air ternyata tidak mampu mengukur

antioksidan lipofilik tetapi reagensnya dimodifikasi dan distandardisasi untuk mengaktifkan simultan pengukuran antioksidan lipofilik dan hidrofilik dalam media NaOH yang ditambahkan *isobutanol-water medium* oleh (Apak, dkk., 2007: 1496–1547). Prosedur yang dimodifikasi berhasil diterapkan pada uji kapasitas antioksidan total trolox, quercetin, asam askorbat, asam galat, katekin, asam caffeic, asam ferulat, asam rosmatinic, glutation, dan sistein, serta antioksidan lipofilik seperti alfa-tokoferol (vitamin), butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, butylhydroquinone, tersier, lauril galat, dan beta karoten.

Polifenol pada tanaman, terdapat beragam kelompok senyawa fenolik (flavonol, antosianin, asam fenolik, dll), yang memiliki struktur kimia yang ideal untuk aktivitas penangkapan radikal bebas. Sifat antioksidan polifenol disebabkan karena kemampuannya sebagai donor hidrogen atau elektron dan kemampuan polifenol untuk menstabilkan dan mendelokalisasi elektron tidak berpasangan (*chain-breaking function*) dan dari potensinya untuk mengkelat ion logam (terminasi reaksi Fenton).

Prosedur uji dilakukan dengan: 0,5 mL ekstrak dan 0,1 mL reagen Folin-Ciocalteu (0,5 N) dicampur dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. 2,5 mL natrium karbonat jenuh ditambahkan dan diinkubasi dalam suhu ruangan selama 30 menit kemudian serapannya diukur pada panjang gelombang 760 nm. Asam galat (McDonald, dkk., 2001: 73–84), asam tanat (Wolfe & Wu, 2003: 609–614), quercetin, asam klorogenat, pyrocatechol atau guaiacol (Yilridim & Oktay, 2001: 23–27), dapat digunakan sebagai kontrol positif. Kandungan total fenolik dinyatakan dalam ekuivalen standar (mg/g senyawa yang diekstraksi). Standar yang digunakan biasanya adalah asam gallat. Kadar fenolic total dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat (GAE g/100 g sampel) (Nurkhasanah, 2015: 402–404).

5. N-N-dimetyl-p-Phenylenediamine (DMPD) Assay

Metode dekolorisasi yang lebih baik untuk mengukur aktivitas antioksidan sampel menggunakan DMPD telah dikembangkan oleh (Asghar, dkk., 2007: 295), untuk mengukur aktivitas antioksidan dalam sampel makanan. Kation radikal DMPD berwarna ungu (DMPD^+) dihasilkan melalui reaksi antara DMPD dan kalium persulfat dan selanjutnya direduksi dengan adanya antioksidan pendonor H (Verde, dkk., 2002: 869–873). Penentuan dilakukan pada pH 5,25 menggunakan buffer asetat 0,1 M. Kation radikal DMPD stabil hingga 12 jam. Satu liter larutan DMPD^+ dan 50 L larutan antioksidan dicampur terus-menerus selama 10 menit pada 25°C , setelah itu diukur absorbansi larutannya pada panjang gelombang 517,4 nm.

Metode ini memiliki keunggulan dibandingkan metode yang digunakan sebelumnya, yaitu ion Fe(II) terlibat dalam pembentukan kation radikal yang melalui reaksi Fenton dapat menyebabkan penyimpangan negatif pada aktivitas antioksidan ekstrak makanan. Uji ini sama-sama dapat diterapkan pada antioksidan lipofilik dan hidrofilik. Metode ini cepat, murah, dapat diproduksi, dan memiliki aspek penggunaan yang menjanjikan dalam menyaring sejumlah besar sampel buah (Asghar, dkk., 2007: 295).

Metode dekolorisasi warna kation radikal DMPD telah dikembangkan untuk pengukuran aktivitas antioksidan dalam sampel makanan dan biologi. Pengujian ini didasarkan pada reduksi larutan buffer DMPD berwarna dalam buffer asetat yang besi klorida. Prosedur ini melibatkan pengukuran penurunan absorbansi DMPD dengan adanya *scavenger* pada absorbansi maksimum 505 nm. Aktivitas tersebut dinyatakan sebagai persentase pengurangan DMPD. Penelitian Fogliano, dkk (1999: 1035-1040) memperoleh radikal dengan mencampurkan 1 ML larutan DMPD (200 mM), 0,4 mL besi klorida (III) (0,05 M), dan 100 mL larutan buffer natrium asetat pada 0,1 M, memodifikasi pH menjadi 5,25. Campuran reaktif harus disimpan dalam bejana gelap dan pada suhu rendah (4-

5°C). Reaksi terjadi ketika 50 µL sampel (pengenceran 1:10 dalam air) ditambahkan ke 950 µL larutan DMPD*. Absorbansi diukur setelah dilakukan 10 menit, yang merupakan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai nilai dekolorisasi warna yang konstan. Hasil dikuantifikasi dalam mM Trolox pada kurva kalibrasi yang relevan.

Berbagai tes atau pengujian beserta protokolnya untuk mengetahui aktivitas antioksidan sudah banyak dipublikasikan. Beberapa menggunakan radikal dan beberapa menggunakan ion logam sebagai agen pengoksidasi. Panjang gelombang yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan berbasis HAT dan ET, ditabulasikan dalam tabel berikut:

Tabel 3. Protokol analisis aktivitas antioksidan pada metode pengujian berbasis HAT dan ET (Gupta, 2015: 546–566)

Assay (Pengujian)	Radical/ Chromophore (radikal/kromofor)	(Panjang Gelombang Pengukuran)	(pH Pengukuran)	Model Pengujian)	HAT / ET Based
ORAC	AAPH (Fluoresein)	485 nm dan 538 nm	pH 7,4	Fluorescence decay measurement	HAT based assay
TRAP (Total Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant)	AAPH (R-phycoerythrin/ Luminol)	495 nm dan 575 nm	pH 7,5	Fluorescence decay measurement	HAT based assay
B-Carotene Bleaching Assay	Peroxyl radicals, ROO	470 nm	pH 5,5 - 7,5	Absorbance measurement	HAT based assay
Crocin Bleaching Assay	Peroxyl radicals, ROO	440 nm	pH 7,0 - 7,5	Absorbance measurement	HAT based assay
Total Phenolic Content	Mo ⁶⁺ (yellow) → Mo ⁵⁺ (blue)	765 nm	pH 10	Absorbance measurement	ET based assay
Ferric ion Reducing Antioxidant Power assay (FRAP)	Chelated Fe ³⁺ ions	595 nm	pH 3,6	Absorbance measurement	ET based assay
DPPH	DPPH	515 nm	pH 7,0 - 7,4	Absorbance measurement	ET based assay
Trolox equivalent Antioxidant capacity (TEAC)	ABTS ⁺	734 nm	pH 7,4 (using PBS)	Absorbance measurement	ET based assay
CUPRAC	Cu ²⁺ → Cu ⁺ (complexed with neocuproine)	450 nm	Acidic/ Neutral/ Alkaline	Absorbance measurement	ET based assay
CERAC	Ce ⁴⁺ → Ce ³⁺	256 nm dan 360 nm	Acidic (0,3 M H2SO4)	Fluorescence decay measurement	ET based assay

Assay (Pengujian)	Radical/ Chromophore (radikal/kromofor)	(Panjang Gelombang Pengukuran)	(pH Pengukuran)	Model Pengujian)	HAT / ET Based
Lipid Peroxidation	N-methyl-2-phenylindole	586 nm	pH 7,4	Absorbance measurement	HAT based assay
Inhibition Assay Hydroxyl radical averting Capacity (HORAC Assay)	HO (p-hydroxybenzoic acid) fluorescein	488 nm dan 515 nm	Phosphate buffer	Fluorescence decay measurement	HAT based assay
Fe ²⁺ ions chelating Assay	Ferrozine-Fe ²⁺ complex	562 nm	pH 4 - 10	Absorbance measurement	ET based assay
Nitric oxide free radical scavenging activity	Griess reagent	546 nm	pH 7,2	Absorbance measurement	ET based assay
Potassium Ferricyanide	Fe ³⁺ → Fe ²⁺	700 nm	pH 6,6	Absorbance measurement	ET based assay
Reducing Power Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)	MDA-TBA Adduct	532 nm	pH 2	Absorbance measurement	ET based assay
N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD)	DPMD (purple)	505 nm	pH 5,25	Absorbance measurement	Fenton type ET based reaction
Photochemiluminescence Assay	O ² (using luminol)	260 nm (blue luminescence)	pH 10,5	Chemiluminescence	HAT reaction

C. Metode Pengujian Lainnya

Selain metode pengujian aktivitas antioksidan HAT dan ET assay, terdapat metode pengujian lain yang dapat juga digunakan untuk mengidentifikasi aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Beberapa metode pengujian/ assay tersebut yaitu *CAA (Cellular Antioxidant-capacity Assay)*, *TLC Bioautography*, *TOSC*, *Chemiluminescence*, *Rauscher oscillation reaction*, *Electronchemiluminescence*, *Fluorometric Analysis*, *Enhanced chemiluminescence*, dan *Dye-substrate oxidation method*. Berikut adalah penjelasan dari beberapa metode pengujian tersebut:

1. CAA (*Cellular Antioxidant Activity*) assay

Model aktivitas antioksidan seluler lebih mewakili kompleksitas sistem biologis dan merupakan alat penting untuk *screening* makanan, fitokimia, dan suplemen makanan untuk aktivitas biologis potensial. Banyak pengujian kimia dilakukan pada pH dan suhu non fisiologis.

Dan karena itu mungkin menjadi indikator yang tidak dapat diandalkan untuk melihat tingkat antioksidan biologis yang sebenarnya. Teknik ini menjelaskan beberapa aspek penyerapan, metabolisme, dan distribusi senyawa antioksidan di dalam sel, sehingga memberikan gambaran yang lebih jelas tentang bagaimana antioksidan bertindak dalam sel hidup (*in vivo*) maupun dengan kultur sel hidup (*in vitro*). CAA memang dapat membantu menentukan aktivitas dan efikasi antioksidan yang sebenarnya dalam tubuh hewan, karena CAA mampu memperhitungkan aspek serapan seluler, distribusi dan metabolisme senyawa antioksidan. Akan tetapi, metode yang digunakan sangat mahal dan tidak cocok untuk skrining initial antioksidan makanan dan suplemen makanan.

Karena hati adalah tempat utama untuk metabolisme xenobiotik, sel hati dapat digunakan sebagai model untuk penentuan stres oksidatif dalam sel yang dikultur untuk mengevaluasi efek kemoprotektif dari senyawa makanan. *Human HepG2, cell line* yang terdiferensiasi yang berasal dari hati digunakan sebagai model yang dapat digunakan untuk pengujian tersebut (Liu, 2005: 4311-4314). Metode CAA adalah pengujian berbasis sel yang memuat sel dengan prekursor diasetat dari senyawa indikator 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), yaitu DCFH-DA yang dioksidasi menjadi DCF ketika *reactive oxygen species* (ROS) seperti radikal peroksil itu ada. Konsentrasi DCF, senyawa fluoresen, dapat diukur dengan menggunakan *fluorescent plate reader*. Pengujian melibatkan penggunaan radikal peroksil yang dihasilkan dari azobis (amidinopropana) dihidroklorida (ABAP).

Ketika sampel asli fitokimia seperti ekstrak buah, sayuran, atau suplemen makanan yang mengandung antioksidan ditambahkan ke pengujian, antioksidan bereaksi dengan radikal peroksil, mencegah radikal peroksil mengoksidasi DCFH. Dengan demikian akan mencegah pembentukan DCF. Akibatnya, fluoresensi menurun karena efek *scavenging* antioksidan. Contoh representatifnya meliputi vitamin, karotenoid, fenolat, dan flavonoid (Wolfe & Liu, 2007: 8896–8907).

Aktivitas antioksidan seluler *in vitro* (*in vitro* CAA) juga dapat dinilai menggunakan *Light-Scattering Properties (turbidity)* eritrosit manusia. Hal ini bergantung pada perbedaan sifat hamburan cahaya antara eritrosit manusia yang lisis dan utuh. AAPH, generator radikal peroksil digunakan untuk meningkatkan peroksidasi lipid. Hemolisis konsekuensi memicu hilangnya kemampuan hamburan cahaya dalam eritrosit yang lisis. Ketika antioksidan ditambahkan, area di bawah *absorbance under curve* (AUC) berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa antioksidan. Metode *Erythrocyte Cellular Antioxidant Activity* (ERYCA) ini ditemukan relatif cepat, sensitif, akurat, dan dapat diulang, bahkan ketika menggunakan eritrosit dari donor yang berbeda dan untuk waktu penyimpanan yang berbeda (Mensah, dkk., 2010: 1486–1491). Uji ERYCA memiliki keuntungan dalam menilai mekanisme *antioxidant protection* yang berbeda, termasuk *direct free radical scavenging* di media sekitarnya dan *antioxidant protection* yang dimediasi sel (Cell-MAP) dalam satu *step/langkah*.

Cell-MAP dapat meliputi hal-hal seperti sifat fisiokimia antioksidan, seperti kelarutannya dalam lipid, kemampuan senyawa yang larut dalam lemak dan air untuk berdifusi secara efektif ke dalam lipoprotein dan membran sel, pertahanan eritrosit melalui mediasi keduanya, *Plasma Membrane Redox System* (PMRS), dan sistem enzim pertahanan anti oksidatif (Mensah, dkk., 2010: 1486–1491).

2. TLC Bioautography

TLC (*Thin Layer Chromatography*) *bioautography* adalah sebuah teknik yang digunakan untuk mengidentifikasi komponen aktif dalam suatu sampel dengan menggunakan metode *chromatography*. Teknik ini sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan dari suatu sampel dengan menggunakan DPPH (1,1-dyphenyl-2-picrylhydrazyl) sebagai indikator. DPPH merupakan senyawa yang memiliki warna violet saat terlarut dalam larutan etanol, dan akan mengalami perubahan warna menjadi merah bila terdapat senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan.

Langkah-langkah umum dan dasar dari TLC bioautography antioksidan dengan penyemprotan DPPH adalah sebagai berikut:

1. Persiapkan bahan yang dibutuhkan, seperti plat TLC, gel silika, solven pemisah, larutan DPPH, sampel yang akan diuji, penyemprotan DPPH, dan lampu UV atau lampu sinar-X.
2. Siapkan plat TLC dan totolkan sampel pada plat TLC menggunakan pipa kapiler.
3. Tuangkan solven/fase gerak ke dalam bejana, lalu masukkan plat TLC yang sudah ditotolkan sampel uji ke dalam bejana.
4. Biarkan sampel tersebut selama beberapa saat hingga sampel tersebut bergerak dan terpisah di dalam plat TLC.
5. Kemudian semprotkan larutan DPPH ke atas plat TLC, lalu tinggalkan plat TLC tersebut selama beberapa saat hingga DPPH mengering.
6. Bila sampel uji memiliki aktivitas antioksidan, maka akan mengubah warna DPPH pada plat tersebut.
7. Bandingkan hasil bioautography dengan sampel yang lain untuk mengetahui tingkat aktivitas antioksidan dari masing-masing sampel (Rafi, dkk., 2011: 71–74).

TLC (*Thin Layer Chromatography*) *bioautography* adalah metode yang menggabungkan pemisahan kromatografi dan penentuan aktivitas biologis in situ. Aktivitas antimikroba, antioksidan, dan penghambatan enzim dapat dilakukan pada TLC *bioautography*. Metode ini utamanya digunakan untuk penyaringan awal produk atau ekstrak alami yang memiliki aktivitas biologis untuk fraksinasi yang diarahkan pada bioaktivitas dan isolasi komponen aktif dari ekstrak yang kompleks.

Bioautografi adalah metode yang mudah untuk mendeteksi zat penghambat pertumbuhan mikroorganisme indikator dalam matriks yang kompleks. Pada awalnya, metode ini terutama dirancang untuk mencari antibiotik dan senyawa anti jamur dalam air limbah, air minum, makanan, tanaman, dan mikroorganisme. Versi pertama dari kromatografi lapis tipis (KLT)/*thin layer chromatography* (TLC) bioautografi dikenalkan

pada tahun 1961 oleh Fisher dan Lautner. Meskipun metode kombinasi kromatografi kertas dan deteksi bioautografi antibiotik dikembangkan untuk pertama kalinya pada tahun 1946.

Saat ini, TLC *bioautography* adalah metode yang menggabungkan pemisahan kromatografi dan penentuan aktivitas biologis *in situ*, yang merupakan metode ideal untuk fraksinasi yang diarahkan oleh aktivitas, karena memungkinkan lokalisasi senyawa aktif secara langsung dan cepat dalam ekstrak kompleks. Dengan demikian, TLC *bioautography* sangat baik untuk dipilih sebagai pilihan pertama untuk mendeteksi komponen aktif dalam ekstrak tumbuhan dan merupakan dasar untuk melakukan langkah pemurnian untuk menghindari isolasi senyawa tidak aktif yang memakan waktu (Quiroga, 2009: 42–46). TLC *bioautography* juga merupakan alternatif untuk *microplate method* dan digunakan sebagai pendekatan *screening* awal untuk evaluasi aktivitas biologis dengan cepat. Dalam dua dekade terakhir, adopsi beberapa uji antioksidan dan uji penghambatan enzim pada TLC sangat memperluas penggunaan TLC *bioautography* sebagai teknik penyaringan. Oleh karena itu, penerapan TLC *bioautography* dalam pencarian produk aktif menarik minat peneliti untuk menggunakan metodenya.

Analisis antioksidan menggunakan TLC *Bioautography* digunakan dalam penelitian Samirana, dkk. (2017) yang menganalisis antioksidan ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana*). Aktivitas antioksidan diuji secara *in vitro* dengan mengukur kemampuan sampel menangkap radikal DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). Sampel uji (ekstrak etanol daun *Z. mauritiana*) dilarutkan dan diencerkan dengan methanol untuk memperoleh seri konsentrasi. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif dibuat dengan konsentrasi stok 1 mg/mL dalam methanol, dan diencerkan untuk menghasilkan seri konsentrasi. Larutan DPPH disiapkan dengan melarutkan 15,8 mg serbuk DPPH dalam labu takar 100 mL. Pengukuran panjang gelombang maksimum dan *operating time* ditentukan sebelum pengukuran sampel.

Penyiapan sampel dilakukan dengan mencampurkan 1,0 mL DPPH 0,4 mM dengan 4 mL methanol, kemudian campuran divorteks dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Campuran larutan ini diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada rentang panjang gelombang 450-550 nm

Fase diam yang digunakan adalah silica gel GF₂₅₄ sedangkan fase gerak yang digunakan tergantung dari golongan senyawa kimia yang akan diidentifikasi dengan TLC. Setelah plat diinkubasi dalam chamber sampai tanda, dan dikeringkan, plat disemprot menggunakan larutan DPPH yang sudah disiapkan. Plat akan menunjukkan spot-spot yang memiliki aktivitas antioksidan dengan menunjukkan warna kuning. Identifikasi spot dapat dikombinasikan dengan identifikasi menggunakan metode yang lain. Spot dan warna yang dihasilkan diamati serta Rf dari masing-masing spot dihitung.

3. Chemiluminescence/Photochemiluminescence

Dalam uji *chemiluminescence*, fotokimia radikal bebas dikombinasikan dengan deteksi sensitif menggunakan *chemiluminescence* (Jimenez, 2002: 64–75). Reaksi diinduksi oleh eksitasi optik dari fotosensitizer S yang menghasilkan generasi radikal superoksida O₂⁻. Radikal bebas divisualisasikan dengan reagen deteksi *chemiluminescence*. Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) bertindak sebagai fotosensitizer dan reagen pendeteksi radikal oksigen, Luminol saat eksitasi memberikan L* oksigen antara dan triplet ³O₂. Setelah radikal O₂⁻ dan luminol dihasilkan, akan terjadi serangkaian reaksi yang menghasilkan produksi pendaran biru. Di hadapan spesies antioksidan oksigen, radikal O₂⁻ keluar bersaing dengan radikal luminal melalui reaksi HAT yang menyebabkan penghentian pendaran sampai konsentrasi antioksidan habis. Hubungan lag/log yang dihasilkan dari senyawa antioksidan dibandingkan dengan keefektifan standar.

Untuk analisis sebanyak 1,5 mL larutan buffer pH 0,5; 1 mL aquades, 25 μ L fotosensitizer dan 10 μ L larutan standar dicampur dan diukur. Potensi antioksidan diuji dengan menggunakan *lag phase* pada konsentrasi yang berbeda.

4. Enhanced Chemiluminescence

Chemiluminescence dihasilkan dari reaksi dengan energi yang sangat tinggi, yang menghasilkan molekul produk yang berpotensi berpendar. Energi reaksi yang diteruskan ke produk dapat menghasilkan keadaan tereksitasi dari satu foton cahaya. Hasil cahaya biasanya rendah, tetapi dapat mendekati satu foton per molekul dalam reaksi bioluminescent yang dikatalisis oleh enzim khusus. Berbagai macam sistem immunoassay yang menggunakan chemiluminescence atau bioluminescence telah dikembangkan dengan tujuan mendeteksi konsentrasi rendah molekul biologis aktif. Bahkan ketika efisien emisi $<1\%$, chemiluminescence adalah metode deteksi yang sensitif dibandingkan dengan metode isotop yang sejumlah besar molekul harus ada untuk setiap disintegrasi yang terdeteksi.

Produksi cahaya dengan latar belakang yang rendah memungkinkan pendeteksian sejumlah kecil molekul yang bereaksi dengan mengukur total keluaran cahaya. Emisi luminescent dapat diukur pada rentang setidaknya 6 kali lipat oleh semua kecuali luminometer paling sederhana. Hal ini sangat kontras dengan deteksi fluoresen atau spektrofotometri produk reaksi, dimana sensitivitas dan rentang linier instrument dibatasi oleh stabilitas sumber cahaya dan pemilihan panjang gelombang.

Misalnya pada spektrofotometer yang baik dapat mencapai rentang linier sedikit lebih besar dari 3 kali lipat. Sistem chemiluminescent langsung menghasilkan <1 foton/label dan memerlukan sintesis kimia kompleks untuk menghasilkan setiap molekul baru. Sistem menggunakan alkaline phosphatase dan peroxidase memiliki

keuntungan tambahan dari ketersediaan komersial dari berbagai molekul berlabel dan kit uji lengkap yang cocok untuk adaptasi deteksi luminescent. Peningkatan chemiluminescence didasarkan pada reaksi luminol (3-aminophthalhydrazide) dengan zat pengoksidasi, seperti hidrogen peroksida atau natrium perborate.

Reaksi ini dikatalisis oleh ion logam pada pH tinggi, menghasilkan emisi cahaya biru (puncak emisi sekitar 425 nm). Reagen untuk meningkatkan chemiluminescence dapat disiapkan di laboratorium atau tersedia secara komersial. Kemurnian larutan substrat penting dalam mencapai sensitivitas maksimum. Bentuk dasar bebas luminol mengalami perubahan menjadi campuran luminol dan sejumlah kontaminan. Oleh karena itu, luminol harus dimurnikan dengan rekristalisasi sebagai garam natrium sebelum digunakan.

Bab 4

Analisis Antioksidan secara *In Vivo*

Dalam metode analisis antioksidan secara *in vivo*, sampel yang akan diuji biasanya diberikan kepada hewan coba seperti tikus, mencit, dan lain sebagainya dengan dosis tertentu dan metode masing-masing. Setelah jangka waktu tertentu, hewan uji coba biasanya dikorbankan dan darah atau jaringannya akan diambil kemudian digunakan untuk pengujian. Terdapat beberapa metode analisis antioksidan secara *in vivo*. Metode ini dibedakan berdasarkan penanda stres oksidatif yang ditimbulkan. Beberapa metode tersebut antara lain adalah uji aktivitas enzim SOD (superoksida dismutase), uji aktivitas enzim katalase, uji aktivitas enzim GPx (glutation peroksidase), dan LPO *Assay* serta dapat pula dengan metode analisis kadar MDA (malonaldehid) yang merupakan metabolit peroksidasi lipid akibat adanya radikal bebas di dalam sel. Tingginya kadar MDA menggambarkan aktivitas radikal bebas. Dalam bab 4 ini, akan dijelaskan lebih lanjut mengenai metode-metode analisis antioksidan secara *in vivo* tersebut.

Superoxide dismutase (SOD) adalah enzim yang berfungsi untuk mengurai superoksida, yaitu molekul oksigen yang memiliki satu

atom oksigen tambahan. SOD mengubah superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi oksigen (O_2) dan air. Superoksida merupakan radikal bebas yang dapat merusak sel, dan SOD berperan dalam menstabilkan molekul ini agar tidak merusak sel. SOD yang terkandung dalam berbagai jenis sel, termasuk se-sel manusia, ini bertanggung jawab untuk mengurangi tingkat radikal bebas di dalam sel. Radikal bebas merupakan molekul yang sangat reaktif serta dapat merusak struktur sel dan DNA, yang dapat menyebabkan penuaan dan berbagai macam penyakit (Pham-huy, L.A., H. He, and C. Pham-huy, 2008: 89-96).

Katalase adalah enzim yang berfungsi untuk mengurai molekul hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air dan oksigen. Hidrogen peroksida merupakan produk sampingan metabolisme sel yang dapat merusak sel jika tidak dikontrol. Katalase mengatalisis reaksi oksidasi yang menggunakan molekul H_2O_2 sebagai substrat, sehingga mengurangi konsentrasi H_2O_2 dan mencegah kerusakan sel (Pham-huy, L.A., H. He, and C. Pham-huy, 2008: 89-96).

Glutathione peroxidase (GPx) adalah enzim yang berfungsi untuk menghilangkan radikal hidroksil yang merusak sel. Radikal hidroksil merupakan radikal bebas yang dapat merusak struktur sel dan menyebabkan kerusakan DNA. GPx mengatalisis reaksi yang menggunakan glutathione sebagai donator elektron untuk mengurangi radikal hidroksil menjadi air (Pham-huy, L.A., H. He, and C. Pham-huy, 2008: 89-96).

A. Uji Aktivitas Enzim SOD (*Superoksida Dismutase*)

Enzim SOD (superoksida dismutase) dibantu oleh tembaga, seng, mangan, dan besi dapat memecah superoksida (yang berperan utama dalam lipid peroksidasi) menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. SOD (superoksida dismutase) hadir hampir di semua sel aerob dan cairan ekstraseluler.

Uji aktivitas enzim SOD disebut juga dengan *SOD Assay*. Berdasar pada metode biokimia, xanthine-xanthine oxidase digunakan untuk menghasilkan O_2 dan reduksi nitroblue tetrazolium (NBT), yang digunakan sebagai indikator produksi O_2 . Urutan penambahan reagen ke dalam larutan uji sangat penting.

Berikut ini adalah langkah umum yang biasa digunakan dalam uji aktivitas enzim SOD:

1. Persiapan Sampel

Sampel yang akan diuji biasanya berupa jaringan atau sel yang telah dikeringkan atau dibekukan, atau dapat juga berupa larutan enzim yang telah disiapkan dari jaringan atau sel yang diolah. Sampel harus dihomogenisasi atau diaduk dengan *buffer* untuk memperoleh sampel yang homogen.

2. Penyiapan Reagen

Reagen yang digunakan untuk uji aktivitas enzim SOD biasanya terdiri dari larutan xanthine (prekursor superoksid), *buffer*, dan pewarna. Xanthine akan dioksidasi oleh superoksid yang terbentuk selama reaksi, sehingga perubahan warna pewarna dapat diamati sebagai indikator aktivitas SOD.

3. Penyiapan Sistem Reaksi

Sistem reaksi yang akan digunakan biasanya terdiri dari sampel, reagen, dan penambah atau inhibitor (opsional). Penambah atau inhibitor dapat digunakan untuk meningkatkan atau mengurangi aktivitas SOD, sehingga dapat memberikan informasi lebih lanjut tentang mekanisme kerja enzim tersebut.

4. Reaksi

Campurkan sampel dan reagen dalam sistem reaksi yang telah disiapkan. Reaksi SOD biasanya dilakukan pada suhu kamar atau suhu yang lebih rendah, selama waktu yang telah ditentukan.

5. Pengukuran Aktivitas SOD

Setelah reaksi selesai, pengukuran aktivitas SOD dapat

dilakukan dengan mengamati perubahan warna pewarna yang terjadi selama reaksi. Biasanya, aktivitas SOD dapat diukur dengan menggunakan spektrofotometer atau *microtiter plate reader* yang dapat mengukur absorbansi pada panjang gelombang yang telah ditentukan.

6. Analisis Hasil

Setelah aktivitas SOD diukur, hasil dapat dianalisis dan dibandingkan dengan standar atau kontrol yang telah disiapkan sebelumnya. Analisis hasil dapat dilakukan dengan menghitung nilai aktivitas rata-rata, menghitung konsentrasi enzim, atau menghitung persentase aktivitas enzim terhadap kontrol.

Catatan: Pada uji aktivitas enzim SOD, sering kali menggunakan pewarna SOD spesifik. Pewarna SOD spesifik adalah senyawa kimia yang digunakan untuk menandai atau mengidentifikasi SOD di dalam sel atau jaringan. Pewarna ini biasanya digunakan dalam studi penelitian untuk mengetahui lokasi, jumlah, dan distribusi SOD di dalam sel atau jaringan. Beberapa contoh pewarna SOD spesifik yang sering digunakan adalah pewarna rutin, pewarna MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], dan pewarna kristal violet. Pewarna-pewarna ini memiliki kemampuan untuk mengikat SOD dan memberikan warna yang diamati dengan mikroskop.

Protokol umum uji aktivitas enzim SOD diterapkan pada penelitian yang dilakukan oleh Winarsi, dkk. (2012: 7-12) dengan sampel berupa darah. Pada penelitiannya tersebut, aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) total plasma pada awalnya dibuat larutan stok SOD. Aktivitas SOD diukur berdasarkan laju penghambatan reduksi ferisitokrom c oleh anion superoksida yang dihasilkan oleh xantin/*xanthine oksidase*. Asam urat dihasilkan dari oksidasi xantin. Anion superoksida yang terbentuk mereduksi ferisitokrom c. Reduksi ferisitokrom c ini diukur berdasarkan kenaikan serapan pada panjang

gelombang 550 nm. Pengukuran dilakukan pada suhu 25°C, tetapi larutan *xanthine oksidase* diusahakan tetap dalam keadaan dingin sebelum digunakan. Reagen disiapkan dengan memasukkan 2,9 mL larutan A (campuran larutan 0,76 mg xantin dalam 10 mL 0,001 M NaOH, dengan larutan 1,8 sitokrom c dalam 100 mL buffer fosfat pH 7,8 tanpa EDTA) ke dalam tabung reaksi 3 mL. Selanjutnya, ditambahkan 50 µL larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks perlahan. Reaksi dimulai dengan menambahkan 50 µL larutan B (*xanthine oksidase* 2,88 mg/mL dalam buffer fosfat EDTA) dan divorteks perlahan. Perubahan serapan yang terjadi diamati pada panjang gelombang 550 nm menggunakan spektrofotometer (Wood, Fitzgerald, dan Lee, 2003: 150-159; Winarsi, Muctadi, dan Zakaria, 2004: 28-34).

Uji aktivitas enzim SOD juga pernah dilakukan penulis pada penelitian tentang efek antioksidan ekstrak rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar*) pada tikus hiperlipidemia. Diet tinggi lemak menyebabkan peningkatan pembentukan ROS. Sementara rimpang Bangle berpotensi sebagai antioksidan dan dapat mengembalikan keseimbangan oksidatif. Pada penelitian yang dilakukan oleh Sari, Nurkhasanah, dan Sulistyani (2004: 28-34), aktivitas enzim SOD ditentukan dengan menggunakan kit Elabscience (*Elabscience Biotechnology Inc*). Anion superoksida (O₂⁻) yang dihasilkan oleh sistem xanthine dapat mengoksidasi hidroksilamin menjadi nitrit yang tampak merah keunguan setelah reaksi kromogenik. Satu unit aktivitas SOD didefinisikan sebagai 1 mg protein jaringan dalam 1 mL yang diperlukan untuk menyebabkan 50% penghambatan. Nilai OD diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 550 nm.

Selain itu, penelitian Mahfudh, dkk. (2022: 2873-2883) yang juga mengevaluasi aktivitas SOD sesuai prosedur dalam kit Elabscience, menunjukkan adanya efek penghambatan spesifik terhadap anion superoksida yang dihasilkan oleh sistem xanthine dan *xanthine oxidase* dan dapat mengoksidasi hidroksilamin menjadi nitrit. Nitrit tampak

keunguan setelah bereaksi dengan reagen kromogenik. Absorbansi diukur pada 550 nm, dan perbedaan nilai absorbansi antara kontrol dan sampel menunjukkan aktivitas SOD.

B. Uji Aktivitas Enzim Katalase

Aktivitas katalase di laboratorium diukur dengan prosedur spektrofotometri yang mengukur penghilangan peroksida (Cullen, 2003: 1297-1303; Lewis, 2006: 523-532). Uji aktivitas enzim katalase dapat dilakukan dengan langkah-langkah umum sebagai berikut:

1. Persiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan, seperti tabung reaksi, pipet, cawan petri, termometer, bahan kimia (H_2O_2), dan sampel yang akan diuji (misalnya jaringan atau sel yang mengandung enzim katalase).
2. Masukkan sampel ke dalam tabung reaksi.
3. Tambahkan H_2O_2 ke dalam tabung reaksi sampai volume total mencapai 5 mL.
4. Masukkan tabung reaksi ke dalam *water bath* yang telah dipanaskan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 15 menit.
5. Setelah 15 menit, ambil tabung reaksi dan pindahkan ke dalam cawan petri.
6. Tambahkan larutan indikator (misalnya larutan *guldberg*) ke dalam cawan petri, lalu aduk hingga merata. (Larutan *guldberg* adalah larutan indikator yang digunakan dalam uji aktivitas enzim untuk mengukur perubahan warna yang terjadi selama reaksi kimia. Larutan *guldberg* terdiri dari guaiakol dan asam sulfat, yang apabila dicampur akan menghasilkan warna biru. Jika terjadi perubahan warna pada larutan *guldberg*, maka menandakan adanya reaksi kimia yang terjadi. Larutan *guldberg* sering digunakan dalam uji aktivitas enzim).
7. Baca hasil uji dengan mengamati warna yang terbentuk. Jika terjadi perubahan warna, maka enzim katalase terdapat dalam

sampel yang diuji. Semakin tinggi aktivitas enzim katalase, maka warna yang terbentuk akan semakin terang.

8. Ulangi uji dengan menggunakan sampel yang berbeda untuk membandingkan aktivitas enzim katalase.

Catatan: Langkah-langkah ini merupakan contoh umum dari uji aktivitas enzim katalase. Ada beberapa variasi yang dapat dilakukan tergantung pada kebutuhan dan tujuan penelitian. Selalu pastikan untuk membaca instruksi dari kit uji atau protokol yang telah disediakan.

Protokol umum dari uji aktivitas enzim katalase tersebut digunakan dalam penelitian Winarsi, dkk. (2012: 7-12) dengan sampel berupa darah. Pengujian aktivitas enzim katalase pada plasma dimulakan dengan pembuatan lisat:

1. Sebanyak 200 μL plasma ditambah 800 μL larutan 0,5% triton X-100.
2. Larutan standar dipersiapkan dengan menyiapkan larutan induk dengan melarutkan 10 μL katalase dalam 50 mL buffer fosfat. Selanjutnya, 0,5 mL larutan induk dilarutkan dalam 9,5 mL buffer fosfat (1/20) dan 0,5 mL larutan induk dalam 19,5 mL buffer fosfat (1/40).
3. Sebanyak 10 μL lisat dicampurkan dengan 12,5 mL buffer fosfat. Reaksi mulai terjadi setelah ditambahkan 1 mL H_2O .
4. Larutan dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya, penurunan absorbansi dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 240 nm, dengan selang waktu 15 detik, 30 detik, 45 detik, dan 60 detik.

Pengukuran aktivitas katalase juga dilakukan pada penelitian penulis yang menggunakan homogenat hati dari tikus yang diinduksi dimetilbenz- α -antrasena (DMBA) yang diberikan perlakuan dengan ekstrak *Hibiscus sabdariffa* (rosella). Uji aktivitas katalase dan peningkatan aktivitas katalase diukur sebagai jumlah reduksi hidrogen peroksida

dari homogenat hati. Sebanyak 0,05 mL supernatan hati ditambahkan 2000 μL 50 mM buffer kalium fosfat (pH 7,0) yang mengandung 10 mM hidrogen peroksida. Jumlah reduksi hidrogen peroksida diukur dengan spektrofotometer pada 240 nm setiap 15 detik selama 1 menit, dan aktivitas katalase dihitung menggunakan nilai kemiringan (Nurkhasanah, dkk., 2018: 851-856).

Selain itu, dalam Mahfudh dkk. (2022: 2873-2883), aktivitas katalase dapat diukur menggunakan kit uji Elabscience sesuai dengan prosedur yang dijelaskan dalam instruksi pabrik itu. Enzim katalase bekerja dengan cara menguraikan H_2O_2 menjadi H_2O . H_2O_2 yang tersisa kemudian berinteraksi dengan amonium molibdat untuk membentuk kompleks kekuningan. Absorbansi diukur pada 405 nm, serta perbedaan absorbansi antara kontrol dan sampel menunjukkan tingkat aktivitas enzim katalase.

C. Uji Aktivitas Enzim GPx (Glutation Peroksidase)

Pengujian untuk mengukur aktivitas GPx dapat dilakukan dengan kumena-hidroperoksida atau tert-butil hidroperoksida sebagai substrat H_2O_2 untuk mengukur total GPx (Liu, dkk., 2006: 105-116). Tert-butil dan kumena-hidroperoksida merupakan hidroperoksida, sedangkan glutathione S-transferase (non-selenium mengandung peroksidase atau selenium independen) dan GPx (mengandung selenium disitus aktif) dapat menggunakan hidroperoksida untuk menentukan aktivitas peroksidase total. Sebaliknya, glutathione S-transferase tidak akan mendetoksifikasi H_2O_2 . Hal ini menunjukkan bahwa pengujian menggunakan kumena-hidroperoksida atau tert-butil hidroperoksida mengukur GPx yang bergantung pada selenium dan aktivitas dari glutathione S-transferase (GPx yang tidak bergantung selenium) (Cullen, 2003: 1297-1303; Liu, dkk., 2006: 239-250).

Uji aktivitas enzim glutathione peroksidase (GPx) dapat dilakukan dengan langkah-langkah berikut:

1. Persiapkan alat dan bahan yang dibutuhkan, seperti tabung reaksi, pipet, cawan petri, thermometer, bahan kimia (seperti H_2O_2 dan *guldberg*), dan sampel yang akan diuji (misalnya plasma darah atau jaringan yang mengandung GPx).
2. Masukkan sampel ke dalam tabung reaksi.
3. Tambahkan larutan H_2O_2 ke dalam tabung reaksi sampai volume total mencapai 5 mL.
4. Masukkan tabung reaksi ke dalam *water bath* yang telah dipanaskan pada suhu $37^{\circ}C$ selama 15 menit.
5. Setelah 15 menit, ambil tabung reaksi dan tambahkan larutan *guldberg* ke dalam cawan petri. Aduk hingga merata.
6. Baca hasil uji dengan mengamati warna yang terbentuk. Jika terjadi perubahan warna, maka GPx terdapat dalam sampel yang diuji. Semakin tinggi aktivitas GPx, maka warna yang terbentuk akan semakin terang.
7. Ulangi uji dengan menggunakan sampel yang berbeda untuk membandingkan aktivitas GPx.

Catatan: Langkah-langkah di atas merupakan contoh umum uji aktivitas GPx. Ada beberapa variasi yang dapat dilakukan tergantung pada kebutuhan dan tujuan penelitian. Selalu pastikan untuk membaca instruksi dari kit uji atau protokol yang telah disediakan.

Protokol umum dari uji aktivitas enzim katalase tersebut digunakan dalam penelitian Winarsi dkk. (2012: 7-12) dengan sampel berupa darah. Langkahnya adalah sebagai berikut:

1. Sebanyak 100 μL plasma diencerkan dengan 200 μL NaCl fisiologis (larutan 0,85% NaCl). Sebanyak 0,1 mL larutan tersebut diambil dan ditambahkan 0,4 mL triton-X 0,5%, larutan ini dinamakan hemolisat.
2. Sebanyak 100 μL hemolisat diambil dan ditambah 100 μL larutan Drabkin dan dikocok, kemudian ditambahkan 2,6 mL buffer fosfat dan homogenkan.

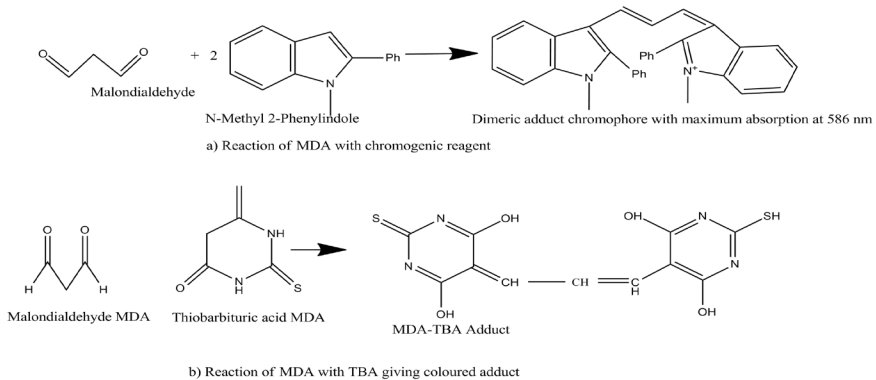
3. Selanjutnya, secara berturutan ditambahkan 0,1 mL NADPH 0,01 mL GSSG-R, 0,01 mL NaN₃, 0,1 mL GSH. Kemudian, dikocok.
4. Sebanyak 1 mL H₂O₂ ditambahkan.
5. Serapan larutan ini dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm, dengan selang waktu 1 sampai 2 menit.
6. Larutan blanko disiapkan dengan 100 µL akuades sebagai pengganti hemolizat (Winarsi, dkk., 2004: 28-34).
7. Satu unit aktivitas GSH-PX didefinisikan sebagai banyaknya GSH-PX yang diperlukan untuk mengoksidasi 1 µmol NADPH per menit.

Selain itu, berdasarkan penelitian Mahfudh, dkk. (2022: 2873-2883), aktivitas GPx dapat diukur menggunakan kit uji Elabscience sesuai dengan prosedur yang dijelaskan dalam instruksi pabrik. GSH bisa berinteraksi dengan asam dinitrobenzoat kuning untuk membentuk anion asam 5-tio-dinitrobenzoat kuning yang persisten. Absorbansi diukur pada 412 nm, dan perbedaan nilai absorbansi antara kontrol dan sampel menunjukkan aktivitas enzim GPx dalam sampel.

D. LPO (Lipid PerOxidation) Assay

Peroksidasi lipid merupakan mekanisme seluler yang dapat digunakan sebagai indikator stres oksidatif yang terjadi dalam sel dan jaringan. Peroksida lipid adalah senyawa yang tidak stabil dan dapat terurai membentuk rangkaian senyawa kompleks termasuk senyawa karbonil reaktif. Peroksida asam lemak tidak jenuh akan menghasilkan malondialdehid (MDA) dan 4-hidroksialkenal (HAE) yang digunakan sebagai indikator peroksidasi lipid (Gupta, 2015: 546-566).

Prinsip pengujian dalam penelitian ini didasarkan pada reaksi reagen kromogenik, N-metil-2-fenilindole, dengan MDA dan 4-hidroksialkenal bereaksi pada 2 molekul N-metil-2-fenilindole untuk menghasilkan kromofor (pewarna karboksianin) yang stabil dengan absorbansi maksimal pada 586 nm seperti ditunjukkan Gambar 2 berikut.



Gambar 2. Reaksi yang Terlibat dalam Uji TBARS dan Uji Peroksidasi Lipid

LPO *Assay* adalah proses autokatalitik yang merupakan konsekuensi umum dari apoptosis/kematian sel. Proses ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan peroksidatif pada peradangan, kanker, serta toksisitas xenobiotic dan penuaan (*aging*). Malondialdehid (MDA) adalah salah satu produk dalam proses peroksidasi lipid. Melondialdehid (MDA) terbentuk selama degenerasi oksidatif sebagai produk radikal bebas oksigen, yang diterima sebagai lipid peroksidasi.

Metode pengujian pada penelitian ini berdasar pada metode LPO *Assay*, yaitu dengan pengukuran jumlah malondialdehid (MDA) yang merupakan hasil utamanya.

1. Menghomogenisasi jaringan dalam buffer 0,1 M pH 7,4 dengan *Teflonglass homogenizer*. Sebanyak 0,2 mL jaringan yang sudah dihomogenisasi dalam buffer tadi ditambahkan dengan 0,2 mL sodium dodesil sulfat (SDS) 8,1%, 1,5 mL asam asetat 20%, dan 1,5 mL TBA 8%. Campuran larutan tersebut ditambahkan dengan aquades hingga volumenya 4 mL, kemudian dipanaskan pada suhu 95°C dengan *water bath* selama 60 menit menggunakan *glass balls* sebagai *condenser*.
2. Setelah diinkubasi, tabung didinginkan di suhu kamar dan volume akhir dibuat menjadi 5 mL pada setiap tabung [5 mL butanol:

pyridine (15:1) ditambahkan dan isinya divortex secara menyeluruh selama 2 menit].

3. Setelah sentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit, lapisan organik bagian atas diambil dan OD-nya diambil pada 532 nm terhadap blanko yang sesuai tanpa sampel.
4. Tingkat peroksida lipid dapat dinyatakan sebagai n mol *ThioBarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) per mg protein menggunakan extinction coefficient $1,56 \times 10^5 \text{ ML cm}^{-1}$ (Ohkawa, dkk., 1979: 351-358).

E. Analisis Kadar MDA (Malonaldehid)

Malonaldehid (MDA) merupakan senyawa dengan 3 rantai karbon yang merupakan ketoaldehid. MDA dihasilkan dari peroksidasi lipid tak jenuh (Davey, 2002). Peroksidasi lipid disebabkan oleh tingginya kadar radikal bebas. Peroksidasi lipid dapat mengakibatkan rusaknya struktur membran, perubahan permeabilitas, menghambat metabolisme, dan perubahan transport ion. Pengukuran kadar MDA dapat digunakan untuk mengukur tingkat peroksidasi lipid (Dalle-Donne, dkk., 2006: 601-623). Malonaldehid (MDA) adalah senyawa yang sangat reaktif, dengan tingkat kadar MDA tinggi sebagai penanda awal terjadinya kerusakan sel dan jaringan (Negre-Salvayre, dkk., 2010: 1125-1171).

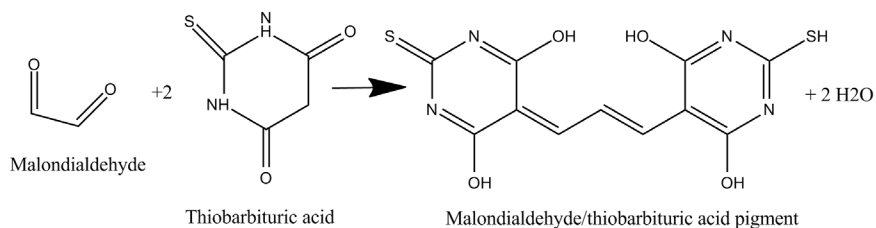
Malonaldehid (MDA) yang merupakan produk akhir dari proses peroksidasi lipid MDA dapat digunakan sebagai penanda terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ini terjadi karena peroksidasi lipid pada membran sel akibat meningkatnya ROS (*reactive oxygen species*). Pada umumnya, peningkatan ROS diikuti dengan meningkatnya akumulasi MDA. Kadar ROS yang tinggi dapat menyerang molekul-molekul penting dalam tubuh, seperti DNA dan dapat mengakibatkan mutasi DNA yang mengarah pada penyakit berat. Analisis kerusakan sel oleh radikal bebas dengan menggunakan pengukuran kadar MDA merupakan analisis secara tidak langsung dan cukup mudah, mengingat

analisis radikal bebas secara langsung cukup sulit dilakukan karena radikal ini sangat tidak stabil (Winarsi, 2007). Radikal bebas akan menangkap elektron yang dimiliki oleh senyawa lain agar dapat stabil. Reaksi ini berlangsung dengan cepat sehingga pengukurannya akan sulit dilakukan secara langsung sebagai senyawa radikal bebas. Oleh karena itu, kadar MDA (malonaldehid) dapat diukur menggunakan metode TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*). Pada reaksi tersebut, MDA bereaksi dengan asam tiobarbiturat dan hasilnya diukur dengan spektrofotometer (Janeiro dan Brett, 2004: 109-115).

Pengukuran kadar MDA serum dapat dilakukan melalui beberapa cara, yaitu:

1. TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substance*)

Asam tiobarbiturat merupakan reagen yang digunakan dalam analisis MDA dengan metode TBARS. Metode TBARS memiliki kelebihan, yaitu relatif mudah dilakukan, cepat memperoleh hasil, dan banyak digunakan. Metode ini didasarkan pada reaksi kondensasi Knoevenagel antara asam 2-tiobarbiturat dengan MDA untuk menghasilkan kromogen. Pembentukan kondensasi Knoevenagel merupakan reaksi yang terjadi antara aldehida dengan senyawa amina (Rizki, dkk., 2017: 149-157). Reaksi yang terjadi pada metode TBARS ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi Antara Asam Tiobarbiturat dengan MDA

Prinsip pengukuran kadar MDA dengan metode ini adalah reaksi 1 molekul MDA akan bereaksi dengan 2 molekul 2-asam-tiobarbiturat dengan melepaskan 2 molekul air (H_2O) seperti disajikan pada gambar 3. Reaksi efektif terjadi pada pH 2-3. TBA akan memberikan warna pink-chromogen yang dapat diukur menggunakan spektrofotometer. Tes TBA selain dapat mengukur kadar MDA yang terbentuk karena proses peroksidasi lipid, juga mendeteksi produk aldehid lainnya yang terbentuk dalam proses pengukuran, termasuk produk aldehid lain yang terjadi akibat panas yang ditimbulkan pada saat pengukuran kadar MDA (hal ini dapat menjadi pengganggu dalam pengukuran). Metode TBARS ini dapat digunakan untuk menentukan kadar MDA dalam plasma, jaringan, maupun urin.

Pada penelitian Rizki, Nurkhasanah, Yuwono, dan Nurani (2017: 149-157), TBARS digunakan untuk menentukan antioksidan secara *in vitro*. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini, berupa sel darah domba karena masih mengandung komponen lipid dan memiliki kemiripan dengan darah manusia. Hal ini pula yang membuat sel darah domba banyak digunakan dalam penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Darah juga dapat dianggap sebagai simulator sistem biologis yang kompleks, dengan penambahan butyl hidroksi peroksida tersier (t-BHP) sebagai peroksida organik yang memicu terjadinya proses oksidasi. Pada penelitian ini, penambahan t-BHP menyebabkan peroksidasi lipid pada sel darah.

Darah domba disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit. Lapisan sel darah dicuci menggunakan larutan PBS (Phosphate Buffer Saline), kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu $-50^{\circ}C$ selama 5 menit.

2. Pengukuran Kadar MDA Serum Bebas dengan Metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

Pengukuran kadar MDA menggunakan HPLC merupakan metode yang paling sensitif dan spesifik. Dalle-Donne, dkk. (2006: 601-623) dan Konig (2002: 6-15) menjelaskan bahwa MDA bukan produk yang spesifik dari proses peroksidasi lipid sehingga dapat menimbulkan positif palsu. Hal ini merupakan tantangan dalam pengembangan metode (Dalle-Donne, dkk. 2006: 601-623; Konig 2002: 6-15).

Pengukuran MDA menggunakan HPLC didahului dengan derivatisasi menggunakan 2,4 dinitrophenylhydrazine (Al-Fawaeir, 2011: 11-14). Prosedur dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Sebanyak 50 μL NaOH 6M ditambahkan dalam 0,250 ml serum dan kemudian diinkubasi pada *water bath* 60°C selama 1 jam. Sampel selanjutnya diasamkan dengan 0,125 ml 35% asam perklorat.
- b. Setelah sentrifugasi selama 10 menit, 0,250 ml supernatan dicampur dengan 25 μL larutan 5mM DNPH dan diinkubasi dalam gelap selama 1 jam.
- c. Sebanyak 100 μL campuran reaksi diinjeksikan ke sistem HPLC.
- d. Standar MDA disiapkan dengan melarutkan 25 μL 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) dalam 100 ml air dan menghasilkan larutan stok 1 mM.
- e. Larutan standard disiapkan dengan melarutkan 1 mL larutan stok dalam 50 mL asam sulfat 1% dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. MDA yang dihasilkan adalah sebanyak 20 $\mu\text{mol/L}$, kemudian diencerkan dalam 1% asam sulfat untuk menghasilkan seri larutan 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,2 $\mu\text{mol/L}$. Sebanyak 0,25 mL larutan standard dicampur dengan 25 μL larutan DNPH dan diinkubasi dalam gelap selama 30 menit. Sebanyak 100 μL larutan diinjeksikan ke sistem HPLC.

Bab 5

Penelitian Terkait Antioksidan

*P*ada bab-bab sebelumnya telah dibahas berbagai hal mengenai antioksidan. Beberapa di antaranya, yaitu definisi antioksidan, jenis antioksidan berdasarkan cara kerja, sumber, dan asalnya; radikal bebas, sumber radikal bebas dan tahap pembentukannya; oksidan dan dampak yang ditimbulkan; prooksidan; *reactive species*; dan stres oksidatif pada bab 1, kemudian ulasan analisis antioksidan secara *in vitro* pada bab 2 dan *in vivo* pada bab 3. Pembahasan selanjutnya merupakan ulasan tentang beberapa penelitian terkait antioksidan yang telah dilakukan oleh penulis dan didukung oleh penelitian lain.

Pada bab ini, penelitian yang telah dilakukan meliputi aktivitas antioksidan pada berbagai ekstrak tanaman dan sumber asal, formulasi fortifikasi yoghurt untuk meningkatkan kandungan sumber antioksidan eksogen alami yang bermanfaat sebagai imunomodulator, yang diperoleh dari berbagai tumbuhan maupun buah-buahan. Terdapat pula beberapa penelitian penulis dan sejawat yang akan membahas tentang efek antioksidan terhadap hewan coba model hiperlipid.

A. Aktivitas Antioksidan Nanopartikel dari Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) yang Berasal dari Indonesia dan Thailand

Ekstrak etanol rosella memiliki khasiat sebagai antihiperlipid (Ulfah dan Wahyuningrum, 2010), antidiabetes (Shou-Chieh, dkk., 2011: 9), antidepresan (Vanzella, dkk., 2012: 41), dan antioksidan (Anokwuru dkk, 2011: 557-566; Tsai dkk, 2002: 351-356). Senyawa yang dominan pada bunga rosella antara lain quercetin, sianidin, beta karoten, dan vitamin C (Tsai, dkk., 2002: 351-356; Mahadevan dan Shivali, 2009: 77-83). Kandungan senyawa tersebut dipengaruhi oleh kondisi tumbuh dengan intensitas sinar matahari dan unsur hara dalam tanah. Indonesia memiliki wilayah yang terletak di garis khatulistiwa, sehingga memiliki wilayah geografis yang berbeda dengan Thailand. Perbedaan ini memengaruhi kandungan senyawa aktif yang dihasilkan rosella (Alfian, 2012: 73-80). Hal tersebut juga berpengaruh pada aktivitas antioksidan ekstrak bunga rosella. Setiap bunga rosella diekstrak menggunakan dua pelarut berbeda, yaitu etanol 60% dan air. Pemilihan etanol 60% berdasar pada kemampuan pelarut yang tinggi dalam melarutkan metabolit sekunder dalam tanaman. Pelarut air digunakan untuk penggunaan empiris bunga rosella dengan menggunakan air mendidih.

Ekstraksi dipekatkan oleh evaporator. Ekstrak kental kemudian dibentuk menjadi ekstrak kering (bubuk) dengan menggunakan *Freeze Dryer*. Penggunaan *Freeze Dryer* bertujuan untuk menghindari kerusakan senyawa aktif dibandingkan dengan menggunakan *Spray Dryer*. Ekstrak yang dibuat menjadi ekstrak kering akan meningkatkan kestabilan metabolit sekunder dan senyawa yang terkandung dalam ekstrak.

Senyawa ekstrak bunga rosella yang memiliki efek antioksidan, yaitu quercetin, sianidin, beta-karoten, dan vitamin C. Oleh karena itu, bunga rosella memiliki daya penyerapan dan bioavailabilitas rendah, serta mudah dimetabolis (Mathur, 2013: 329-338). Flavonoid sebagai

salah satu zat aktif dapat digunakan sebagai salah satu marker bagi aktivitas antioksidan.

Total kadar flavonoid ditetapkan menggunakan quercetin sebagai standar. Dibuat persamaan kurva standar menggunakan rangkaian level. Panjang gelombang maksimum hasil pemindaian adalah 412 nm. Persamaan kurva standar yang diperoleh adalah $Y = 0,1359 X - 0,1356$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,997. Selanjutnya, sampel disiapkan dan dibaca absorbansinya, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan kurva standar. Hasil penentuan kadar flavonoid total ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Penentuan Kadar Flavonoid Total Kelopak Bunga Rosella

No.	Sampel	Kadar Total Flavonoid (ug/mg)	Kadar Total Flavonoid (%)
1.	Ekstrak etanol rosella asal Thailand	4,03 ± 0,14 µg/mg	0,40 %
2.	Ekstrak etanol rosella asal Indonesia	3,51 ± 0,09 µg/mg	0,35 %
3.	Ekstrak air rosella asal Thailand	2,67 ± 0,07 µg/mg	0,26 %
4.	Ekstrak air rosella asal Indonesia	2,50 ± 0,08 µg/mg	0,25 %

Berdasarkan Tabel 4, hasil pengukuran menunjukkan bahwa kandungan tertinggi flavonoid total ekstrak etanol bunga rosella asal Thailand sebesar 0,40 %, sedangkan kadar flavonoid total ekstrak etanol bunga rosella asal Indonesia masih lebih rendah, yaitu 0,35 %. Hal ini kemungkinan karena pengaruh tempat tumbuh. Bunga rosella dari Thailand memiliki warna yang sangat merah dibandingkan dengan yang berasal dari Indonesia. Hal ini menyebabkan kandungan total flavonoid yang tinggi pada ekstrak bunga rosella yang berasal dari Thailand. Selain itu, bunga rosella dari Indonesia dibeli dari petani sudah dalam bentuk tumbuhan kering. Proses pengeringan yang tidak

sesuai dapat menyebabkan bahan aktif rusak, sehingga kadar total flavonoid rendah.

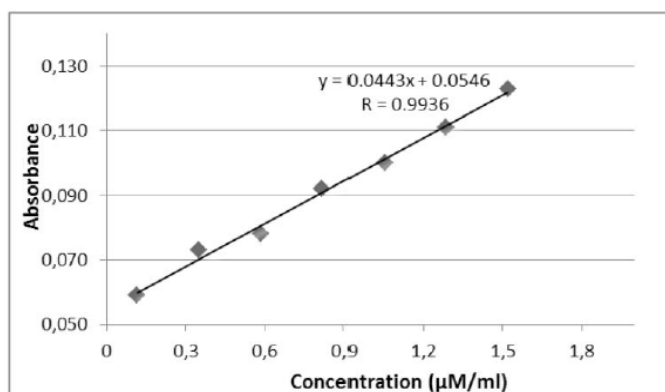
Pada penelitian yang dilakukan oleh Mun'im dan Hanani (2008: 47-54), ditemukan bahwa kandungan flavonoid total pada ekstrak bunga rosella sebesar 0,25 %. Jika dibandingkan dengan hasil penelitian tersebut, ketiga ekstrak pada penelitian ini memiliki kandungan total flavonoid yang lebih tinggi. Perbedaan ini dipengaruhi oleh perbedaan tempat tumbuh karena bunga rosella yang digunakan dalam penelitian Mun'im dan Hanani berasal dari Bogor. Perbedaan tempat tumbuh akan memengaruhi konsentrasi zat yang terkandung dalam bunga rosella (Simbolon dan Achmad, 2011).

Kandungan flavonoid total pada ekstrak etanol bunga rosella lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak air. Hal ini sesuai dengan penelitian Anokwuru, Esiaba, dan Ajibaye (2011: 557-566) yang menyatakan bahwa kandungan flavonoid total pada rosella lebih tinggi menggunakan etanol dibandingkan air. Studi lain juga menyatakan bahwa etanol memiliki kemampuan yang baik untuk menarik flavonoid (Kumar, 2012).

Pada penelitian tersebut, antioksidan ditentukan dengan menggunakan *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) (Devasagayam dan Boloor, 2003: 300-308). Sel darah merah domba masih mengandung komponen lipid dan memiliki kemiripan dengan darah manusia, sehingga banyak digunakan dalam penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Darah plasma masih mengandung komponen lipid, sehingga dapat digunakan sebagai model *in vitro* untuk menguji aktivitas antioksidan. Darah juga dapat dianggap sebagai simulator sistem biologis yang kompleks. Butil hidroksi peroksida tersier (t-BHP) merupakan bahan yang digunakan sebagai peroksida organik yang memicu terjadinya proses oksidasi. Pada penelitian ini penambahan t-BHP menyebabkan peroksidasi lipid sel darah merah.

Asam tiobarbiturat merupakan reagen yang digunakan dalam analisis MDA dengan metode TBARS. Metode TBARS memiliki kelebihan, yaitu relatif mudah dilakukan, cepat diperoleh hasil, dan banyak digunakan (Devasagayam dan Bloor, 2003: 300-308). Metode tersebut berdasar pada reaksi kondensasi Knoevenagel antara asam 2-tiobarbiturat dengan MDA untuk menghasilkan kromogen.

Standar yang digunakan adalah malondialdehid bis (dimethyl acetal). Dibuat tujuh rangkaian berbeda (*multiple point method*), kemudian dilakukan pembacaan absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum hasil pemindaian adalah 532 nm. Hasil kurva standar ditunjukkan pada Gambar 4.

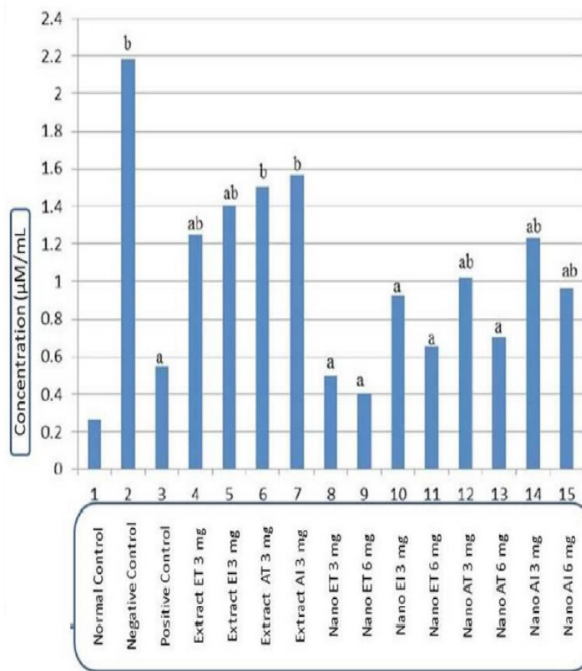


Gambar 4. Kurva Standar MDA

Prosedur percobaan diawali dengan penyiapan sel darah merah domba, kemudian ditambahkan sampel yang akan diuji. Pada proses ini, sampel merupakan senyawa yang akan melindungi sel darah merah. Selanjutnya, penambahan t-BHP memicu peroksidasi lipid, sehingga terjadi malondialdehid (MDA). Peningkatan kadar MDA akan menunjukkan tingginya peroksidasi lipid yang terjadi. Senyawa yang memiliki kemampuan antioksidan akan mampu mencegah

kerusakan sel darah akibat pemberian t-BHP, sehingga kadar MDA menjadi rendah.

Eksperimen dilakukan dalam 15 kelompok dengan 3 ulangan. Hasil uji aktivitas antioksidan disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Uji Aktivitas Antioksidan

Keterangan:

ET = Ethanol Thailand

EI = Ethanol Indonesia

AT = Air Thailand

AI = Air Indonesia

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dari ekstrak dan nanopartikel. Hal ini disebabkan penghambatan proses peroksidasi lipid, MDA yang terbentuk rendah. Kemampuan antioksidan ekstrak bunga rosella dalam menghambat proses peroksidasi lipid sesuai dengan penelitian yang dilakukan Anokwaru, Esiaba, dan Ajibaye (2011: 557-566). Selain itu, penelitian lain oleh

Kumar (2012) juga menunjukkan bahwa ekstrak bunga rosella memiliki kemampuan untuk menetralsir radikal bebas.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa nanopartikel dari 4 ekstrak memiliki kemampuan antioksidan yang lebih baik dibandingkan bentuk ekstrak. Nanopartikel ekstrak etanol kelopak bunga rosella asal Thailand memiliki aktivitas antioksidan terbaik.

B. Formulasi dan Fortifikasi Yoghurt dengan Ekstrak Buah Lakum [*Cayratia trifolia* (L.) Domin] sebagai Antioksidan

Lakum [*Cayratia trifolia* (L.) Domin] banyak mengandung antosianin. Antosianin pada buah lakum memiliki kestabilan yang tinggi jika disimpan pada suhu rendah, kondisi asam, dan tanpa cahaya. Produk asam seperti yoghurt dapat memberikan kondisi optimum untuk stabilitas antosianin dan aktivitas antioksidan. Fortifikasi yoghurt dari ekstrak buah lakum diformulasikan dengan konsentrasi 0%, 5%, 7,5%, dan 10% untuk mengetahui formula mana yang memiliki stabilitas antosianin dan antioksidan terbaik.

Pengujian mutu yoghurt dilakukan dengan menganalisis karakteristik fisik-kimia dan mikrobiologi seperti organoleptic, sensori, viskositas, pH, kandungan asam laktat, total protein, kadar lemak, dan total bakteri asam laktat, serta pengujian stabilitas dengan menjaga pada suhu 4°C. Kemudian, dilakukan pengujian total antosianin menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH pada hari ke 0, 7, 14, 21 dan 28.

Ekstrak buah lakum pada penelitian ini diperoleh dengan cara diekstrak menggunakan pelarut air melalui pemanasan selama 120 menit pada suhu 70°C. Temperatur itu dipilih berdasarkan penelitian oleh Neliyanti dan Idiawati (2014: 86-93) yang menunjukkan bahwa ekstraksi pigmen antosianin yang optimal dari buah lakum adalah pada suhu 70°C. Selanjutnya, ekstrak buah lakum diformulasikan dalam bentuk yoghurt dengan menggunakan bakteri asam laktat,

Streptococcus thermophilus dan *Lactobacillus bulgaricus*. Bakteri tersebut dapat mengubah laktosa menjadi asam laktat. Penambahan buah lakum pada yoghurt bertujuan untuk memanfaatkan buah lakum sebagai pewarna alami dan menambah manfaat fungsional yoghurt sebagai produk antioksidan karena kandungan senyawa antosianinnya (Yeo, dkk., 2012: 331-338).

Tabel 5. Stabilitas Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Buah Lakum dan Fortifikasi Yoghurt Ekstrak Buah Lakum

Formula	% of Inhibition				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
Lakum 5%	50.91±0.52 ^{aD}	43.20±1.29 ^{aD}	37.48±0.38 ^{aC}	30.14±0.07 ^{aB}	25.54±1.01 ^{aA}
Lakum 7.5%	59.08±1.20 ^{bD}	57.26±1.01 ^{bD}	49.79±0.47 ^{bC}	39.47±0.28 ^{bB}	30.14±0.07 ^{bA}
Lakum 10%	64.64±0.68 ^{cD}	61.11±0.47 ^{cD}	52.53±1.06 ^{cC}	40.88±1.80 ^{cB}	32.88±0.64 ^{cA}
Plain	45.48±1.88 ^{aC}	39.97±0.62 ^{aC}	35.95±0.69 ^{aC}	27.36±0.89 ^{aB}	19.82±0.80 ^{aA}
Yoghurt 5%	60.07±0.57 ^{bC}	55.01±0.68 ^{bC}	49.79±0.47 ^{bC}	39.47±0.28 ^{bB}	30.63±0.73 ^{bA}
Yoghurt 7.5%	69.15±0.24 ^{cC}	64.64±0.68 ^{cC}	60.07±0.57 ^{cC}	52.53±1.06 ^{cB}	44.61±0.56 ^{cA}
Yoghurt 10%	75.79±0.72 ^{dC}	70.85±0.51 ^{dC}	64.64±0.68 ^{dC}	57.26±1.01 ^{dB}	49.79±0.58 ^{dA}

Formula yoghurt ekstrak buah lakum 10% memiliki aktivitas antioksidan (% inhibisi) tertinggi. Semakin tinggi kandungan senyawa antosianin pada ekstrak maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Hal ini disebabkan adanya zat antioksidan pada pigmen ekstrak lakum, seperti pigmen antosianin (Widhiana, 2012).

Selain itu, nilai rata-rata aktivitas antioksidan yoghurt ekstrak buah lakum pada hari ke-0 lebih tinggi dibandingkan ekstrak lakum. Hal ini sejalan dengan penelitian Mohamed, Zayan, dan Nadia (2014: 816-822) yang menyatakan bahwa yoghurt merupakan bahan pangan fungsional karena komponen senyawa bioaktif seperti aktif peptide dan asam amino berperan sebagai antioksidan, sehingga kestabilan dan kualitas produk ekstrak lakum dalam yoghurt akan meningkat.

Tabel 6. Hasil Evaluasi Fortifikasi Yoghurt Ekstrak Lakum

Evaluation	Result				Standard Indonesia National
	F I Plain	F II Lakum 5%	F III Lakum 7.5%	F IV Lakum 10%	
Total BAL	42.10 ⁷ ±2.0 ^a	47.10 ⁷ ±1.0 ^b	48.2.10 ⁷ ±0.52 ^{bc}	49.5.10 ⁷ ±0.55 ^c	Min. 10 ⁷
Fat Content	4.13±0.09 ^c	3.95±0.04 ^{bc}	3.73±0.03 ^b	3.52±0.04 ^a	Min. 3.0%
pH	4.25±0.13 ^c	4.06±0.06 ^{bc}	3.87±0.03 ^b	3.62±0.03 ^a	Max. 4.5
Total Acid	0.74±0.2 ^a	0.78±0.12 ^b	0.83±0.06 ^{bc}	0.90±0.15 ^c	0.5-2.0%
Viscosity (cP)	825.20±4.18 ^c	762.78±3.87 ^{bc}	639.07±2.06 ^b	510.88±3.15 ^a	-
Protein Content	2.80±0.12 ^a	3.26±0.4 ^{ab}	4.90±0.11 ^b	5.04±0.28 ^c	Min. 2.7%

Penambahan ekstrak lakum dapat meningkatkan laju pertumbuhan BAL arena ekstrak lakum memiliki kandungan karbohidrat yang digunakan oleh BAL untuk menghasilkan asam laktat sebagai produk utama (Kumar, dkk., 2012). Kombinasi *Lactobacillus bulgaricus* dengan *Streptococcus thermophilus* menghasilkan pertumbuhan yang lebih baik, karena selama masa inkubasi yoghurt, kedua bakteri saling memberi nutrisi sebagai stimulator pertumbuhan (Muhsinin dan Rizaldi, 2016).

Kandungan lemak pada penelitian ini sesuai dengan SNI (2009), yaitu minimal 3,0%. Kandungan lemak pada yoghurt ditentukan oleh bahan dasarnya, yaitu susu *full cream* yang mengandung lemak tinggi. Berdasarkan nilai kadar lemak yang diperoleh, dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak lakum mampu menurunkan kadar lemak yoghurt karena kadar air ekstrak lakum tinggi.

Hasil evaluasi pH yoghurt menunjukkan bahwa pH terendah terdapat pada yoghurt ekstrak lakum 10%, sedangkan pH tertinggi terdapat pada yoghurt tawar. Nilai masing-masing formula yoghurt yang diperoleh menunjukkan kisaran nilai pH yang normal untuk produk yoghurt (Pereira, dkk., 2013: 62-76). Pada yoghurt, pH rendah berperan dalam menekan laju pertumbuhan mikroorganisme patogen dalam tubuh (Widagdha dan Nisa, 2015: 248-258).

Hasil evaluasi kadar asam terendah terdapat pada yoghurt tawar, sedangkan kadar asam tertinggi terdapat pada yoghurt ekstrak lakum 10%. Kadar asam yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan SNI (2009), yaitu antara 0,5-2,0%. Peningkatan kadar penambahan lakum secara linier memengaruhi laju peningkatan asam laktat yang

terkait dengan β -gal menjadi lebih efektif dengan senyawa aktif seperti flavonoid dan turunan antosianin yang tinggi dalam ekstrak lakum.

Hasil evaluasi viskositas tertinggi terdapat pada yoghurt tawar dan viskositas terendah pada yoghurt ekstrak lakum 10%. Penurunan viskositas pada fortifikasi yoghurt ekstrak lakum dapat dipengaruhi oleh penambahan ekstrak lakum ke dalam yoghurt. Peningkatan konsentrasi ekstrak lakum yang ditambahkan akan meningkatkan kadar air dalam yoghurt dan berakibat pada penurunan viskositas.

Hasil evaluasi kandungan protein tertinggi terdapat pada yoghurt ekstrak lakum 10%, dan kandungan protein terendah terdapat pada yoghurt tawar. Kandungan protein yang diperoleh dalam penelitian ini sesuai dengan SNI (2009), yaitu minimal 2,7%. Mulyani, Fajariyah, dan Pratiwi (2016: 48-57) menyatakan bahwa kandungan protein pada yoghurt ditentukan oleh jumlah bahan tambahan, dengan indikasi semakin tinggi kandungan protein pada bahan tambahan maka semakin tinggi pula kandungan protein yoghurt yang dihasilkan.

Antosianin memiliki manfaat antioksidan dengan bertindak sebagai donor elektron atau transfer atom hidrogen terhadap radikal bebas (Widhiana, dkk., 2012). Penelitian terdahulu oleh Neliyanti dan Idiawati (2014: 86-93) menjelaskan bahwa antosianin pada ekstrak lakum memiliki stabilitas yang tinggi jika disimpan pada suhu rendah, keadaan asam, dan tanpa paparan cahaya.

C. Efek Antioksidan Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar*) terhadap Aktivitas Superoksida Dismutase (SOD) pada Tikus Hiperlipidemia

Hiperlipidemia adalah gangguan metabolisme yang ditandai dengan peningkatan kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan penurunan HDL dalam darah. Hiperlipidemia dapat disebabkan oleh penggunaan diet tinggi lemak jangka panjang (Karam, 2017: 1-8). Diet tinggi lemak dapat meningkatkan pembentukan ROS. Peningkatan

produksi ROS menyebabkan stres oksidatif yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan (Agustin, 2016). Stres oksidatif menyebabkan penyakit kardiovaskular, penyakit degeneratif, dan penyakit metabolik dengan berbagai komplikasi. Stres oksidatif dapat merusak struktur DNA, protein seluler, dan protein fungsional yang ada dalam sel.

Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar*) berpotensi sebagai antioksidan dan dapat mengembalikan keseimbangan oksidatif. Tubuh membuat antioksidan endogen (enzim antioksidan) yang digunakan untuk menetralkan radikal bebas (Bouayed dan Torsten Bohn, 2010: 228-237). Salah satu enzim antioksidan yang mampu mengatalisis dismutase radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2) adalah Superoksida dismutase (SOD). Selain faktor antioksidan enzimatik, sistem pelindung juga terdiri dari antioksidan non enzimatik (eksogen) seperti vitamin E, vitamin C, fenol, flavonoid, atau senyawa lainnya. Salah satu cara penyediaan komponen tersebut adalah dengan mengonsumsi buah-buahan, sayuran, dan rempah-rempah.

Bangle (*Zingiber cassumunar*) merupakan tumbuhan tradisional yang biasa digunakan sebagai bumbu masak di Indonesia (Nurkhasanah, dkk., 2017). Kandungan kimia rimpang bangle adalah golongan fenolik, flavonoid, kurkuminoid, dan minyak atsiri yang merupakan senyawa antioksidan potensial (Nurkhasanah, dkk., 2017; Padmasari, dkk., 2013: 1-7). Penelitian telah membuktikan aktivitas antioksidan rimpang *Z. cassumunar* secara *in vitro* menggunakan uji DPPH; ekstrak rimpang bangle memiliki aktivitas antioksidan pada dosis 100 $\mu\text{g/mL}$ dengan daya hambat sebesar 41,23%.

Proses ekstraksi dilakukan sebanyak 1 kg simplisia rimpang *Z. cassumunar* dan menghasilkan ekstrak kental sebanyak 48,2 g (4,82%). Pelarut yang digunakan dalam proses ini adalah etanol 96% yang akan memecah dinding sel sehingga pelarut dapat menembus sel dan

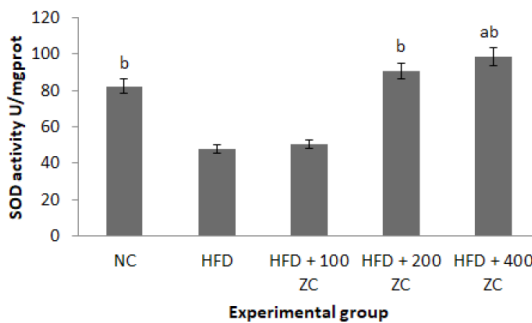
menarik metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Etanol 96% adalah pelarut universal karena memiliki koefisien partisi pelarut signifikan yang menarik senyawa polar dan non-polar ((Nurkhasanah, dkk., 2017; Padmasari, dkk., 2013: 1-7).

Kurkumin ekstrak *Z. cassumunar* merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan. Hasil penentuan kadar kurkumin ekstrak *Z. cassumunar* yang ditentukan dengan KLT-densitometri ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Kandungan Kurkumin pada Ekstrak *Z. cassumunar*

Sample replication	Area	Content of curcumin (mg/ml)	Content of curcumin (%)	Mean \pm SD
I	22837.67	0.33	6.6	7.3 \pm 0.58
II	23990.91	0.38	7.7	
III	23842.28	0.37	7.5	

Menurut Farmakope Herbal Indonesia, kandungan kurkumin pada rimpang bangle tidak boleh kurang dari 5%. Kadar kurkumin dalam penelitian ini memenuhi persyaratan. Hasil dari penelitian penulis ini juga menunjukkan efek penurunan aktivitas enzim SOD pada tikus yang diberi makan HFD. Penurunan aktivitas enzim SOD pada penelitian ini disebabkan oleh konsumsi HFD berimplikasi pada kelebihan produksi ROS. Namun, aktivitas enzim SOD akan meningkat saat mengonsumsi *Z. cassumunar*. Aktivitas enzim SOD pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Efek Antioksidan Ekstrak Rimpang *Z. cassumunar* terhadap Aktivitas SOD Hati Tikus

Enzim SOD mengatalisis superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen, sehingga mengurangi kemungkinan anion superoksida bereaksi dengan oksida. Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak rimpang *Z. cassumunar* memiliki aktivitas antioksidan dan mampu memperbaiki efek ROS dari HFD.

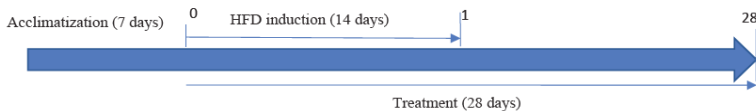
D. Ekstrak Etanol Daun Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.) Meningkatkan Aktivitas Antioksidan Endogen pada Tikus Hiperlipidemic

Konsumsi makanan tinggi lemak dapat menginduksi pembentukan radikal bebas dan memicu stres oksidatif. Daun ubi jalar (*Ipomoea batatas* L.) dilaporkan berpotensi sebagai antioksidan *in vitro*. Ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) adalah tanaman umbi-umbian yang ditanam secara luas di seluruh dunia karena manfaat nutrisinya. Banyak penelitian yang melaporkan aktivitas antioksidan dan radikal bebas dari akar umbi yang membantu mencegah berbagai jenis penyakit degeneratif. Daunnya mengandung beberapa nutrisi dan senyawa fitokimia, seperti serat, vitamin C, flavonoid, terpenoid, saponin, polifenol, tannin, dan alkaloid (Islam, dkk., 2003: 693-699; Meira, dkk., 2012: 682-713; Rumbaoa, dkk., 2009:1133-1138).

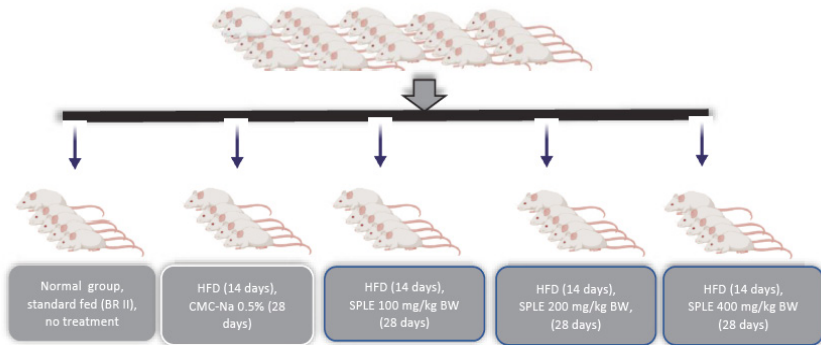
Oleh karena itu, efek farmakologis daun ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L.) menarik untuk diteliti. Menurut laporan sebelumnya, perlakuan dengan ekstrak daun dapat menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida sekaligus meningkatkan *high density lipoprotein* (HDL) plasma pada tikus diabetes (Heriwijaya, dkk., 2020: 452-456; Kurata, dkk., 2017: 57-62). Selanjutnya, tikus yang telah diinduksi diet tinggi lemak dan diberi perlakuan dengan daun ubi jalar selama 35 hari ditemukan memiliki perubahan pada metabolisme lipid (Kurata, 2017: 57-62). Daunnya juga terbukti efektif untuk menurunkan stres oksidatif pada tikus hiperlipidemia (Chen, dkk., 2011: 360-364).

Penelitian ini menyelidiki pengaruh ekstrak etanol daun ubi jalar ungu terhadap aktivitas antioksidan endogen pada tikus hiperlipidemia. Daun ubi jalar dikeringkan dengan oven dan diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan perbandingan 1:7 b/v selama 24 jam, diikuti dengan penguapan vakum. Kemudian, dibentuk lima kelompok hewan uji, antara lain kontrol normal yang diberi diet standar, kontrol negatif [diet tinggi lemak (HFD) selama 14 hari], dan tiga kelompok perlakuan yang diberi HFD selama 14 hari dan mulai dari hari yang sama. Perlakuan ekstrak daun ubi jalar diberikan dengan dosis 100, 200, dan 400 mg/kg BB selama 28 hari. Aktivitas antioksidan diukur dari homogenat hati pada hari ke-29. Aktivitas superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GSH-Px), dan malondialdehid (MDA) dikuantifikasi menggunakan spektrofotometri.

Analisis HPLC menemukan kandungan utama ekstrak daun ubi jalar ungu, HFD secara signifikan menurunkan aktivitas antioksidan endogen (SOD, CAT, dan GSH-Px) dan meningkatkan kadar MDA secara signifikan dibandingkan dengan kelompok normal. Sebaliknya, pengobatan dengan ekstrak daun ubi jalar ungu secara signifikan meningkatkan aktivitas SOD, CAT, dan GSH-Px, serta menurunkan kadar MDA secara signifikan tergantung dosis, apabila dibandingkan dengan kontrol negatif. Ekstrak daun ubi jalar ungu meningkatkan aktivitas antioksidan enzimatis endogen pada tikus hiperlipidemia.



Gambar 7. Desain Induksi dan Perawatan HFD



Gambar 8. Pembagian Kelompok Perlakuan Hewan

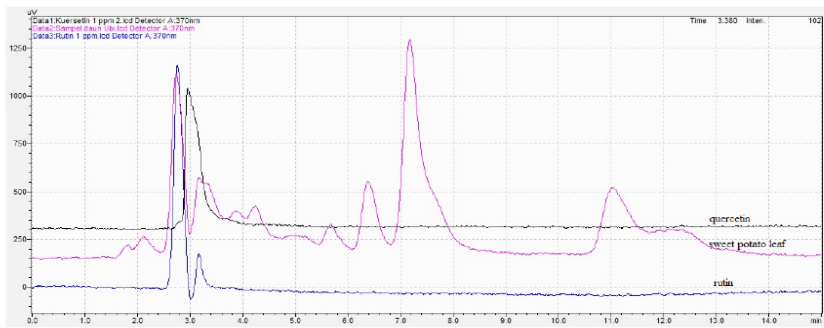


FIGURE 3. The HPLC chromatogram of sweet potato leaf extract in comparison with rutin and quercetin

Gambar 9. Kromatogram HPLC Ekstrak Daun Ubi Jalar Dibandingkan dengan Rutin dan Quercetin

Bab 6

Efek Stress Oksidatif pada Patogenesis Penyakit Diabetes Mellitus

A. Diabetes Mellitus

Diabetes mellitus (DM) adalah penyakit gangguan metabolisme yang ditandai dengan meningkatnya kadar gula dalam darah akibat gangguan sekresi atau fungsi insulin atau keduanya (Dedov II dan Shestakova, 2019). Peningkatan kadar glukosa darah (gula darah) yang terjadi pada diabetes mellitus ini dapat mengakibatkan kerusakan serius pada jantung, pembuluh darah, mata, ginjal, dan saraf.

Diabetes mellitus terbagi menjadi 3 jenis, yaitu: diabetes tipe 1, diabetes tipe 2, dan diabetes gestasional (diabetes yang terjadi selama masa kehamilan). Diabetes tipe 2 merupakan diabetes yang paling banyak terjadi. DM tipe 2 biasanya terjadi pada orang dewasa karena tubuh resisten terhadap insulin atau tidak menghasilkan cukup insulin. Prevalensi diabetes tipe 2 meningkat secara signifikan pada 3 dekade terakhir di berbagai negara, baik negara maju maupun negara berkembang.

Diabetes tipe 1, dikenal sebagai *juvenile diabetes* atau *insulin-dependent diabetes*, disebabkan sel beta pankreas tidak mampu memproduksi insulin. Diabetes tipe ini dapat diderita oleh anak-anak maupun orang dewasa. Diabetes tipe 1 ini berhubungan dengan kondisi autoimun dan kerusakan sel-sel beta pankreas penghasil insulin.

B. ROS (Reactive Oxygen Species)

ROS adalah molekul yang mengandung oksigen aktif secara kimia yang dihasilkan dalam sistem kehidupan. Mereka adalah produk metabolisme oksigen alami di semua organisme aerobik (Sies, 2020). Jenis ROS utama meliputi superoksida, radikal hidroperoksil, radikal singlet, radikal hidroksil, oksida nitrat, peroksinitrit, dan lain-lain (Sies, 2020: 363-383). ROS utamanya dihasilkan di mitokondria, tetapi ada juga mekanisme alternatif yang berkontribusi pada pembentukannya, seperti NADPH-oksidadase (NOX), reaksi imun, xantin oksidase, metabolisme asam arakidonat, dan lain-lain (Forrester, dkk., 2018: 877-902).

Pada penderita diabetes mellitus, tingkat ROS tinggi di lingkungan hiperglikemia, sehingga stres oksidatif dapat meningkat (Hui Yang, dkk., 2011: 1773-1782). Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa diabetes mellitus menyebabkan peningkatan pembentukan radikal bebas.

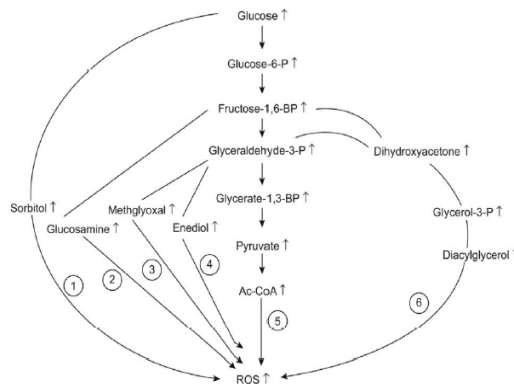
C. Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan. Definisi lain dari stres oksidatif adalah pembentukan berlebih dan/atau penghilangan molekul yang sangat reaktif secara tidak memadai (Hui Yang, 2011: 1773-1782). Peningkatan akumulasi ROS menyebabkan stres oksidatif, yang berkontribusi terhadap kerusakan komponen seluler utama, termasuk lipid, protein, dan DNA (Sifuentes-Franco, dkk., 2017). Sistem pertahanan antioksidan memberikan pertahanan kritis untuk sistem biologis dengan

membatasi efek merusak dari ROS. Ada banyak enzim antioksidan, termasuk superoksida dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), dan glutathione reduktase (GR), katalase, paraoxanase (PON), dan lain-lain (Ozougwu, 2016: 1-8). Selain antioksidan enzimatik, pertahanan antioksidan non-enzimatik seperti askorbat, tokoferol, retinol, karotenoid, glutathione tereduksi (GSH), melatonin, polifenol, ceruloplasmin, carnosine, dan lain-lain juga berperan penting dalam mempertahankan kadar ROS normal (Mironczuk-Chodakowska dan Witkowska, 2018: 68-78).

D. Stres Oksidatif dan Patogenesis Diabetes Mellitus

Stres oksidatif terkait dengan peningkatan generasi ROS memainkan peran penting dalam patogenesis diabetes mellitus (Bigagli, 2019). Mekanisme molekuler utama yang terkait dengan stres oksidatif pada diabetes mellitus juga berhubungan dengan metabolisme glukosa dan lipid (Ighodaro, 2018: 656-662). Ada 6 jalur metabolisme (lihat Gambar 10) yang akan menyebabkan kondisi stres oksidatif akibat hiperglikemik: (1) metabolisme sorbitol; (2) metabolisme heksosamin; (3) pembentukan dikarbonil dan glikasi; (4) enolisasi dan pembentukan α -ketoaldehida; (5) fosforilasi oksidatif; dan (6) aktivasi protein kinase C (PKC).



Gambar 10. Generasi ROS yang Diinduksi Hiperglikemia dan Akibat Aktivasi Jalur Patologis

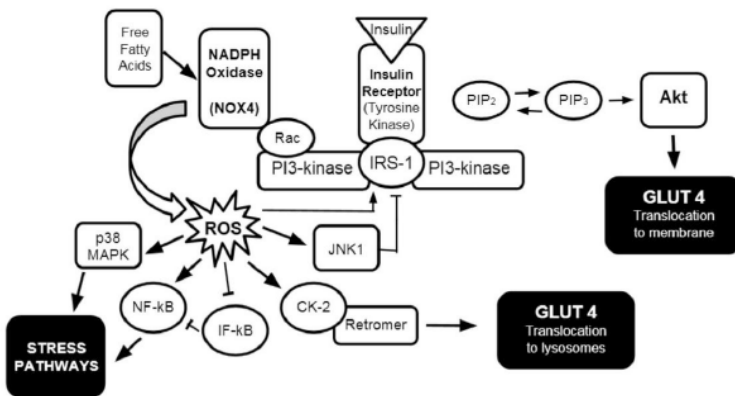
Stres oksidatif menyebabkan cedera seluler yang dapat mendahului timbulnya banyak komplikasi diabetes, antara lain (1) cedera sel diabetik dan perkembangan resistensi insulin juga terkait erat dengan adanya stres oksidatif seluler; (2) fluktuasi glukosa akut dapat meningkatkan stres oksidatif; (3) meningkatnya kadar glukosa seluler juga dapat mengakibatkan peningkatan produksi spesies oksigen reaktif (ROS); (4) meningkatkan timbulnya DM dengan menurunkan sensitivitas insulin dan merusak sel penghasil insulin di dalam pankreas (Hui Yang, dkk., 2011: 1773-1782).

E. Stres Oksidatif dan Resistensi Insulin

ROS dan RNI telah terbukti memengaruhi kaskade pensinyalan insulin. Konsentrasi ROS milimolar telah terbukti memainkan peran fisiologis dalam pensinyalan insulin melalui mekanisme yang bergantung pada NAD(P)H oksidase. Setelah stimulasi insulin terjadi ledakan produksi H_2O_2 , menciptakan paparan ROS jangka pendek dan dosis rendah. Hal ini meningkatkan kaskade insulin dengan menghambat aktivitas tirosin fosfatase, yang menyebabkan peningkatan fosforilasi tirosin basal dari reseptor insulin dan substratnya (Mahadev, dkk., 2004: 1844-1854). Berdasar pada penelitian Nass, Vogel, Hofmann, dkk (2010: 749-754), glikasi protein seperti faktor pertumbuhan turunan platelet (PDGF) dan kolagen telah dilaporkan berkontribusi terhadap komplikasi dengan meningkatkan kekakuan pembuluh darah dan mengubah struktur dan fungsi pembuluh darah (Goh, 2008: 1143-1152). Hal tersebut menunjukkan bahwa penurunan enzim antioksidan dan penghambatan aktivitas enzimatik akibat glikasi pada diabetes secara signifikan berkontribusi pada lingkungan oksidatif keseluruhan yang terlihat pada penderita diabetes. Hasil paling umum dari pensinyalan insulin yang terganggu adalah resistensi insulin.

Resistensi insulin terjadi ketika kadar insulin normal tidak memadai untuk menghasilkan respons normal dari sel lemak, hati, atau otot.

Berbagai penelitian seluler telah menunjukkan bahwa di bawah kondisi stres oksidatif, pensinyalan insulin terganggu, mengakibatkan resistensi insulin pada sel (Eriksson, 2007: 3734-3742). Banyak sekali penelitian yang dilakukan dengan mengukur penyerapan glukosa, glikogen, dan sintesis protein dalam sel setelah memaparkannya ke H_2O_2 . Hubungan antara stres oksidatif dan gangguan pensinyalan insulin melalui beberapa mekanisme seperti ROS mengganggu pensinyalan insulin yang disebabkan oleh penginduksian fosforilasi serin/treonin IRS, gangguan redistribusi seluler komponen pensinyalan insulin, penurunan transkripsi gen GLUT4, atau perubahan aktivitas mitokondria (Morino dan Petersen, 2006: 9-15). Pengaruh ROS terhadap jalur pensinyalan insulin terlihat pada Gambar 11 (Hurrelle, 2017: 257-262).

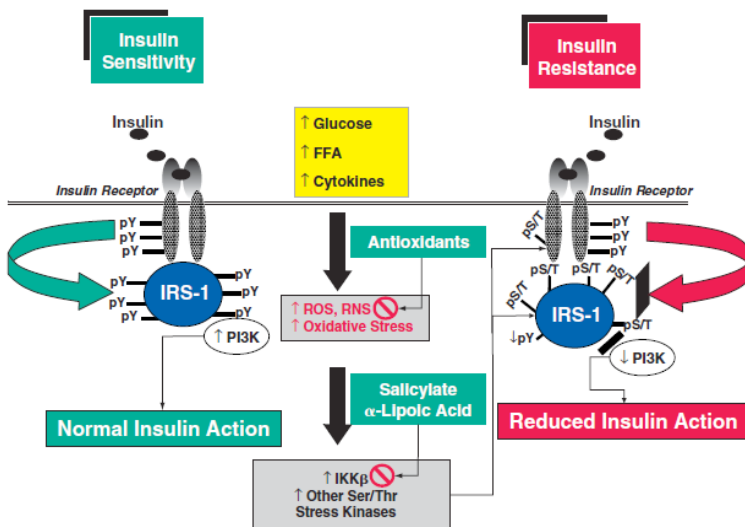


Gambar 11. Pengaruh ROS terhadap Jalur Pensinyalan Insulin

Jalur pensinyalan reseptor insulin termasuk pengaruh ROS. Jalur normal dimulai dengan pengikatan insulin pada reseptor tirosin kinase insulin. Reseptor insulin memfosforilasi PI3-kinase. PI3-kinase kemudian memfosforilasi PIP2 yang kemudian mengaktifkan Akt (Ighodaro, 2018: 656-662). Akhirnya, mengarah ke translokasi transporter glukosa 4 (GLUT4) ke membran plasma sel otot rangka

dan adiposit, sehingga memungkinkan sel untuk menyerap glukosa ekstraseluler, menurunkan kadar glukosa interstitial dan konsentrasi glukosa plasma. Singkatan yang digunakan, antara lain PIP2 dan PIP3: spesies phosphatidylinositol; Rac: Rac GTPase; ROS: Spesies oksigen reaktif; JNK1: c-Jun N terminal kinase 1; CK-2: Kasein kinase 2; NF- κ B: faktor nuklir κ B; IF- κ B: Faktor penghambatan κ B; p38 MAPK: p38 protein kinase teraktivasi mitogen; Akt: protein kinase B.

Stres oksidatif juga menyebabkan terjadinya resistensi insulin melalui aktivasi protein serin kinase, seperti terlihat pada Gambar 12 (Evans dan Maddux, 2005).



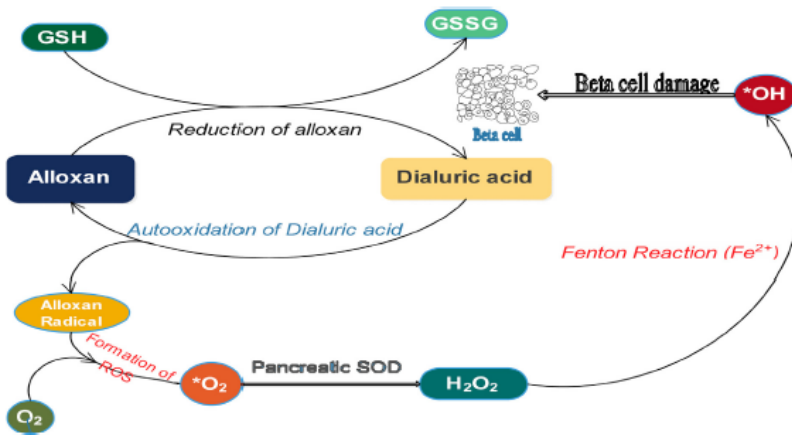
Gambar 12. Peran Aktivasi Serin Kinase dalam Resistensi Insulin Akibat Stres Oksidatif

Berbagai rangsangan, termasuk asam lemak bebas (FFA) yang ditinggikan oleh hiperglikemia, sitokin, dan lain sebagainya, meningkatkan produksi ROS dan RNS serta stres oksidatif. Hal ini menghasilkan aktivasi beberapa kaskade pensinyalan serin/treonin kinase yang sensitif terhadap stres, seperti IKK dan lain-lain. Setelah diaktifkan, kinase ini mampu memfosforilasi beberapa target, termasuk

reseptor insulin dan protein IRS seperti IRS-1 dan IRS-2. Peningkatan fosforilasi reseptor insulin atau protein IRS pada situs serin atau treonin diskrit (pS/T) menurunkan tingkat fosforilasi tirosin yang distimulasi insulin (resistensi insulin). Efek protektif dari antioksidan (misalnya LA, N-acetylcysteine, dll.) pada resistensi insulin yang diinduksi stres oksidatif dapat berhubungan dengan kemampuan mereka untuk menjaga keseimbangan redoks intraseluler (menetralkan ROS) atau analog dengan agen farmakologis (misalnya salisilat, penghambat MAPK p38), dengan memblokir aktivasi kinase yang peka terhadap stres.

F. Penelitian *in Vivo*

Model penelitian diabetes mellitus secara *in vivo* menggunakan aloksan dan streptozotosin (STZ) sebagai sumber radikal bebas (ROS) untuk menginduksi terjadinya stres oksidatif. ROS ini yang merusak pankreas sehingga jumlah sel beta pankreas mengalami penurunan, dan berakibat pada penurunan produksi insulin. Dosis aloksan yang biasa digunakan untuk menyebabkan tikus menjadi diabetes minimal 150 mg/kgBB. Aloksan dan STZ adalah agen diabetogenik paling populer yang digunakan untuk menilai kapasitas antidiabetes atau hipoglikemik senyawa uji. Khususnya, aloksan jauh lebih murah dan lebih mudah didapatkan daripada STZ. Aloksan yang secara kimia dikenal sebagai 5,5-dihidroksil pyrimidine-2,4,6-trion merupakan senyawa organik, turunan urea, bersifat karsinogen dan analog glukosa sitotoksik. Senyawa tersebut memiliki rumus molekul, $C_4H_2N_2O_4$ dan massa molekul relatif 142,06. Sayangnya, aloksan bersifat sangat tidak stabil, harus segera digunakan setelah dilarutkan dalam air. Gambar 13 berikut akan memperlihatkan proses pembentukan ROS dari senyawa aloksan yang akan menyebabkan kerusakan sel beta pankreas (Ighodaro dan Adeosun, 2018: 1-10).



Gambar 13. Pembentukan ROS Melalui Siklus Redoks Aloksan

Streptozotocin [2-Deoxy-2-({[methyl(nitroso)amino] carbonyl} amino)- β -d-glucopyranose] (STZ) adalah inti biotik yang dibuat oleh jamur *Streptomyces achromogenes* dan dapat digunakan keduanya dalam satu dosis tinggi atau beberapa dosis rendah untuk memberikan diabetes kronis. STZ juga bekerja melalui transporter GLUT2 dan terakumulasi intra seluler membentuk diazometana produk alkylating, yang mengakibatkan kematian sel beta melalui alkilasi DNA dalam sel-sel beta. Penghancuran sel beta oleh STZ bersifat multifactorial. STZ sendiri adalah donor oksida nitrat, dan ini dapat berdampak langsung pada DNA, serta menyebabkan kerusakan. Selain itu, STZ menyebabkan produksi radikal bebas seperti superoksida, salah satunya aloksan, yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan DNA akibat peroksidase hidrogen dan hidroksil melalui gangguan produksi ATP di mitokondria. Kerusakan DNA ini menyebabkan aktivasi poli ADP-ribosilasi yang mengurangi NAD^+ intraseluler dan selanjutnya menurunkan ATP yang tersedia di mitokondria. Pengurangan ATP secara keseluruhan ini menyebabkan lebih sedikit sintesis dan sekresi insulin dari sel beta. Kelebihan glukosa berikutnya kemudian mengaktifkan jalur PKC dan menghasilkan produk glikasi hilir yang

mengakibatkan stres oksidatif lebih lanjut, serta apoptosis sel, nekrosis, dan kerusakan DNA (Goyal, dkk., 2016: 46-63).

STZ juga memiliki kemampuan untuk mengaktifkan NFκB secara langsung dan tidak langsung, yang pada gilirannya menyebabkan produksi sitokin dan disregulasi mitokondria, berkontribusi terhadap gangguan sel beta. STZ memiliki waktu paruh 15 menit. Oleh karena itu, STZ direkomendasikan harus diberikan sebagai sediaan segar setiap kali, dilarutkan dalam buffer sitrat pH 4,5 untuk efek maksimum. Ada banyak perbedaan dosis antara spesies dan galur dengan dosis berkisar antara 100 hingga 300 mg/kg untuk dosis tinggi dan 30-80 mg/kg untuk beberapa injeksi dosis rendah (Deeds, 2011: 131-140).

G. Bahan-bahan Alam yang Mempunyai Aktivitas Hipoglikemik dan Mencegah Terjadinya Stres Oksidatif

1. Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Sambiloto, dikenal sebagai *king of bitter*, merupakan tanaman yang banyak tumbuh di wilayah Asia. Khususnya di Asia Tenggara, termasuk Indonesia, tanaman ini sudah banyak dipakai untuk pengobatan berbagai macam penyakit serta sebagai suplemen herbal. Penelitian terhadap sambiloto terkait stres oksidatif dan DM telah banyak dilakukan. Salah satu contohnya, ekstrak etanol sambiloto ternyata mempunyai efek nephroprotektif pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin dari kerusakan oksidatif yang dimediasi hiperglikemik pada jaringan ginjal tikus diabetes. Kadar protein serum meningkat, sedangkan kadar kolesterol dan urea berkurang secara signifikan ($P < 0,01$) pada kelompok perlakuan ekstrak etanol sambiloto dibandingkan dengan kelompok normal. Tingkat peroksida lipid dalam plasma dan jaringan ginjal ditemukan meningkat, sedangkan enzim jaringan ginjal superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase ditemukan menurun pada tikus diabetes yang diinduksi streptozotocin bila dibandingkan dengan tikus normal.

Setelah pemberian ekstrak etanol sambiloto, aktivitas dan kadar enzim antioksidan (SOD, Katalase, dan GPx) meningkat kembali secara signifikan ($P < 0,01$) mendekati tingkat normal. Perubahan histologis yang nyata pada ginjal tikus diabetes selama 32 hari menunjukkan adanya hipertrofi epitel tubulus, glomerulosklerosis, dan akumulasi glikogen. Pengobatan dengan ekstrak sambiloto memberikan perlindungan yang signifikan dari kerusakan ginjal, sedangkan kerusakan tubular lebih parah pada tikus yang diobati dengan glibenklamid (Sivakumar, 2015: 287-294).

2. Kayu Manis (*Cinnamomum burmanii*)

Kayu manis adalah salah satu bahan ramuan tradisional yang digunakan di Korea, China dan Rusia untuk diabetes mellitus. Komponen utamanya adalah aldehida sinamat, asam sinamat, dan polimer metilhidroksikalkon (MHCP).

Kayu manis mampu memperbaiki sensitivitas insulin yang diteliti pada tikus. Efek antidiabetes ekstrak kulit kayu manis *Cinnamomi cassia* (famili: Lauraceae) pada model hewan diabetes tipe II (C57BLKsj db/db) telah dipelajari dengan memberikan ekstrak kayu manis dalam dosis berbeda (50, 100, 150, dan 200 mg/kg) selama 6 minggu.

Pada penelitian tersebut, ditemukan bahwa konsentrasi glukosa darah menurun secara signifikan tergantung dosis ($P < 0,001$) dengan penurunan terbanyak pada kelompok 200 mg/kg dibandingkan kontrol. Selain itu, kadar insulin serum dan kadar kolesterol HDL secara signifikan lebih tinggi ($P < 0,01$), sedangkan konsentrasi trigliserida, kolesterol total, dan aktivitas glikosidase usus secara signifikan lebih rendah setelah 6 minggu pemberian. Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak kayu manis memiliki peran pengatur kadar glukosa darah dan lipid juga dapat memberikan efek penekanan glukosa darah dengan meningkatkan sensitivitas insulin atau memperlambat penyerapan karbohidrat di usus kecil (Kim, dkk., 2006: 119-123).

Bab 7

Stres Oksidatif dan Demensia

A. Radikal Bebas

Radikal bebas atau oksidan adalah spesies kimiawi yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya (Gilbert, 2000: 1-4; Riley, 1994: 27-33). Radikal bebas bersifat tidak stabil, reaktif, dan memiliki kemampuan bereaksi dengan molekul lain untuk mencari pasangan elektronnya menjadi senyawa yang lebih stabil (Kato, dkk., 1995: 1721-1723). Radikal bebas dapat bersumber dari eksogen dan endogen. Sumber eksogen berasal dari absorpsi radiasi lingkungan seperti sinar ultraviolet, rokok, pestisida, polusi lingkungan yang berasal dari asap kendaraan bermotor, serta zat toksik lainnya. Di sisi lain, sumber endogen berasal dari reaksi oksidatif yang terjadi selama proses metabolisme normal atau metabolisme enzimatik dari senyawa kimia eksogen (Murray, dkk., 2006). Senyawa ini dapat berasal dari mitokondria, sitokrom P450, peroksisom dan aktivasi sel inflamasi (Inoue, dkk., 2003: 2495-2505).

Radikal yang dihasilkan tersebut umumnya adalah *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Pham-Huy, 2008: 89-96). ROS dapat dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu radikal bebas dan non

radikal bebas. Molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dan reaktif terhadap molekul lain disebut sebagai radikal bebas. Namun, ketika 2 radikal bebas saling memberikan elektron yang tidak berpasangan maka akan dihasilkan non radikal (Birben, dkk., 2012: 9-19). Senyawa yang termasuk radikal bebas oksigen adalah radikal superoksida, hidroksil, peroksil ($\text{RO}_2\bullet$), alkoksil ($\text{RO}\bullet$), dan hidroperoksil ($\text{HO}_2\bullet$). Sedangkan yang termasuk radikal nitrogen adalah nitrik oksida dan nitrogen dioksida ($\bullet\text{NO}_2$). Oksigen dan nitrogen dapat dikonversi menjadi spesies reaktif non radikal lainnya seperti hidrogen peroksida, asam hipoklorit (HOCl), asam hipobromit, serta peroksinitrit (ONOO^-) (Fang, 2002: 872-879).

Spesies-spesies tersebut dapat berperan ganda, yaitu sebagai senyawa yang menguntungkan tetapi juga merupakan senyawa toksik (Lopaczynski dan Zeisel, 2001: 295-307). Pada kadar yang cukup, ROS dan RNS dapat berperan dalam fungsi biologis, salah satunya sebagai bakterisid dan bakteriolitik. Selain itu, radikal tersebut juga berperan untuk menghasilkan energi atau proses transport elektron (ATP tubuh), sebagai mediator pada infeksi patogen, sinyal apoptosis sel atau jalur sinyal transduksi dan *second messenger*, juga untuk sintesis eikosanoid (Batish, dkk., 2006: 819-827). Namun, pada konsentrasi yang tinggi, spesies-spesies tersebut dapat menyebabkan stres oksidatif, yang dapat merusak struktur sel (Birben, dkk., 2012: 9-19; Valko, dkk., 2006: 1-40).

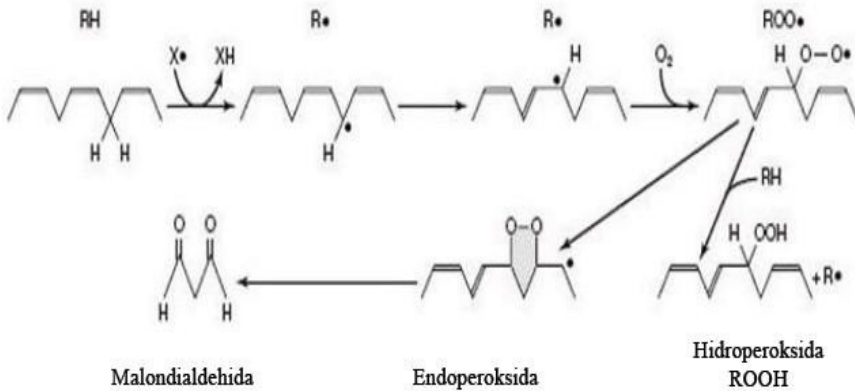
B. Peroksidasi Lipid

Peroksidasi lipid merupakan mekanisme destruksi oksidatif asam lemak tak jenuh ganda (PUFA) yang terbentuk dari proses autokatalitik tidak terkontrol yang menghasilkan pembentukan asam lemak hidroperoksida dan senyawa aldehid (Cheeseman dan Slater, 1993: 481-493). Asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel adalah target dari peroksidasi lipid (Anthonymuthu, 2016: 57-76). Proses

tersebut dapat dipicu oleh radikal bebas seperti anion superoksida, hidroksil, dan peroksil (McCord, 2000: 652:659).

Proses peroksidasi lipid biasanya diawali dengan penarikan atom hidrogen yang mempunyai satu elektron dari ikatan rangkap PUFA untuk membentuk radikal lipid. Penambahan oksigen akan menghasilkan radikal peroksil lipid yang kemudian akan menarik lagi atom hidrogen dari ikatan rangkap PUFA lain, sehingga terbentuk radikal lipid berikutnya. Radikal peroksil lipid tersebut pada akhirnya akan mengalami dekomposisi menjadi lipid peroksida (Desai, Farris, dan Ray, 2014: 89-93).

Menurut Murray, dkk. (2009: 161-171) serta Gurr dan James (1980), proses peroksidasi lipid terdiri atas tiga tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Fase inisiasi dimulai dengan pelepasan sebuah atom hidrogen oleh radikal bebas dari gugus metilena ($-\text{CH}_2-$) dari *polyunsaturated fatty acid* (PUFA), sehingga membentuk radikal karbon ($-\text{CH}^\bullet-$) pada PUFA. Radikal karbon menjadi stabil dengan pengaturan ulang ikatan rangkap yang membentuk diena terkonjugasi. Apabila diena terkonjugasi bereaksi dengan oksigen, maka akan terbentuk radikal lipid peroksida (ROO^\bullet). Pada fase propagasi, radikal lipid peroksida juga mampu mengikat atom hidrogen dari molekul lipid lain yang berdekatan sehingga membentuk radikal lipid lain. Radikal lipid akan bereaksi dengan O_2 mengakibatkan reaksi peroksidasi lipid terus terjadi (Murray, dkk., 2009: 161-171). Pembentukan endoperoksida lipid pada PUFA yang mengandung sedikitnya tiga ikatan rangkap akan menyebabkan terbentuknya *malondialdehyde* (MDA), sebagai hasil dari reaksi peroksidasi. Fase terminasi terjadi saat adanya senyawa antioksidan dan membentuk spesies nonradikal atau saat dua molekul radikal bebas bereaksi (Murray, dkk., 2009: 161-171). Proses peroksidasi lipid dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Proses Peroksidasi Lipid

Sumber: Murray, dkk. (2009: 161-171)

Markesbery (1997: 134-147) melaporkan bahwa peroksidasi lipid adalah penyebab utama kerusakan membran fosfolipid pada penderita demensia Alzheimer (AD). Produk peroksidasi lipid, yaitu *4-hydroxynonenal* (HNE), ditemukan dengan konsentrasi tinggi pada pasien AD (Gabbita, Lovell, dan Markesbery, 1998: 2034-2040). Hal ini terbukti toksik terhadap kultur sel hippocampus. Senyawa aldehida diduga menyebabkan kematian sel dengan memengaruhi enzim ATPase yang terkait dengan transfer ion dan homeostasis kalsium (Mark, dkk., 1997: 255-264). Peningkatan konsentrasi kalsium dapat menyebabkan peristiwa kaskade intraseluler yang akan meningkatkan ROS dan kematian sel (Mattson, 2005: 679-682).

C. Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan yang terdapat di dalam tubuh dimana keberadaan radikal bebas melampaui kapasitas antioksidan di dalam tubuh (Fang, dkk., 2002: 872-879; Powers dan Jackson, 2008: 1243-1276). Tingginya radikal tersebut dapat berasal dari reperfusion oksigen saat kondisi hipoksia, metabolisme oksigen, oksidasi hemoglobin

dan mioglobin, dan lain sebagainya (Finaud, Lac, dan Filaire, 2006: 327-358). Radikal bebas dalam jumlah normal dapat berperan pada biosintesis hormon fertilisasi, sebagai sistem pertahanan, dan sinyal seluler (Paravicini dan Touyz, 2008: S170-S180).

Stres oksidatif yang berlangsung terlalu lama dapat menimbulkan kerusakan pada DNA, protein, lipid sehingga dapat memicu terjadinya degeneratif (Finaud, Lac, dan Filaire, 2006: 327-358). Telah dilaporkan bahwa stres oksidatif berkontribusi pada perkembangan penyakit seperti kanker, gangguan neurologik, aterosklerosis, hipertensi, iskemia, diabetes, sindrom distress respirasi akut, fibrosispulmonar idiopatik, dan asma (Jenner, 2003: S26-S38; Sayre, Smith, dan Perry, 2001: 721-738; Dhalla, Temsah, dan Netticadan, 2000: 655-673; Kašparová, dkk., 2005: 601-611; Asami, dkk., 1997: 1763-1766; Dut, dkk., 2008: 1605-1609).

Berdasarkan penelitian Grotto, dkk. (2009: 169-174), Paneta dan Clemens (1994: 239-245), serta Siswonoto (2008), otak merupakan organ yang mudah mengalami stres oksidatif. Hal ini disebabkan salah satunya karena metabolisme otak membutuhkan oksigen dalam jumlah besar. Otak menggunakan sekitar 50% dari seluruh oksigen tubuh padahal bobot otak hanya berkisar 2% dari berat badan. Selain itu, hampir 50% dari struktur jaringan otak mengandung PUFA. Otak juga mempunyai antioksidan alami lebih rendah daripada jaringan lain meskipun kandungan asam askorbatnya 100 kali lipat dibanding di pembuluh darah perifer (Grotto, dkk., 2009: 169-174; Paneta dan Clemens, 1994: 239-245; Siswonoto, 2008).

Saat ini, untuk mengetahui adanya stres oksidatif dapat digunakan penanda biologi. Hal ini bertujuan agar adanya penyakit dan efikasi dari suatu obat dapat segera diketahui. Penanda dapat ditemukan di darah, urin, dan cairan biologis yang lain. Beberapa penanda spesifik untuk mengetahui kerusakan pada bagian tertentu dari tubuh, misalnya: lipid peroksida, MDA, dan 4-hidroksinonenal (HNE) sebagai penanda

kerusakan oksidatif pada lipid; iso-prostan sebagai produk radikal bebas oksidasi asam arakhnoik; 8-oksoguanin (8-hidroksiguanin) dan *thymineglycol* sebagai indikator kerusakan oksidatif pada DNA; serta protein karbonil, hidroksileusin, hidrovalin, dan nitrotirosin merupakan produk oksidasi protein dan asam amino (Morita, dkk., 2012: 758-765).

Telah dilaporkan bahwa otak penderita demensia Alzheimer mengalami stres oksidatif yang ditandai dengan peningkatan senyawa yang mengindikasikan adanya oksidasi protein (protein karbonil, 3-nitrotirosin), peroksidasi lipid (MDA, HNE; F2-isoprostan dan F4-neuroprostan), dan oksidasi asam nukleat (8-hidroksi-2-deoksiguanosin, 8-hidroksiguanosin) (Markesbery, 1997: 134-147; Sayre, Smith, dan Perry, 2001: 721-738; Hensley, dkk., 1995: 2146-2156).

D. Antioksidan

Antioksidan adalah suatu molekul atau senyawa yang mempunyai kemampuan menstabilkan atau deaktivasi radikal bebas sebelum radikal bebas tersebut menyerang tubuh (Rahman, 2007: 219). Antioksidan akan menstabilkan radikal bebas yang berlebih, sehingga memberi perlindungan pada sel dari efek toksik dan mencegah terjadinya penyakit (Pham-Huy, dkk., 2008: 89-96).

Senyawa antioksidan di dalam tubuh diklasifikasikan menjadi 2, yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan non enzimatis (Fang, dkk., 2002: 872-879; Kharrazi, dkk., 2008: 932-936). Kedua antioksidan tersebut akan bekerja secara sinergis. Antioksidan enzimatis yang secara langsung terkait dengan penetralan ROS dan RNS adalah superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), dan glutaion reduktase (GRx) (Butterfield, dkk., 2002: 655-664; Ceriello, 2008: S181-S184; Gandhi dan Abramov, 2012). SOD menjadi pertahanan lini pertama melawan radikal bebas, dengan mengatalisis dismutasi superoksida anion radikal ($O_2^{\cdot-}$) menjadi

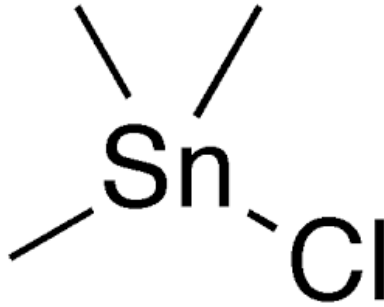
hidrogen peroksida (H_2O_2) melalui reaksi reduksi. Oksidan yang terbentuk (H_2O_2) kemudian ditransformasi menjadi air dan oksigen (O_2) oleh katalase atau glutathionperoksidase. Enzim selenoprotein GPx mengoksidasi glutathion tereduksi (GSH) menjadi glutathion teroksidasi (GSSG). Glutathion reduktase adalah merupakan enzim flavoprotein. Enzim ini akan meregenerasi GSH dari GSSG dengan sumber tenaga NADPH untuk mereduksi. Di samping hidrogen peroksida, GPx juga mereduksi lipid atau nonlipid hidroperoksida selama mengoksidasi glutathion (GSH) (Bahoran, dkk., 2006; Dröge, 2002: 47-95; Genestra, 2007: 1807-1819; Halliwell, 2006: 312-322).

Antioksidan non-enzimatik terdiri dari antioksidan metabolik dan antioksidan nutrien. Antioksidan metabolik dihasilkan oleh proses metabolisme di dalam tubuh seperti glutathion, asam lipoid, L-arginin, melatonin, koenzim Q10, protein pengkelat, bilirubin, asam urat, transferrin, dan lain-lain (Dröge, 2002: 47-95; Willcox, dkk., 2004: 275-295). Sedangkan nutrien antioksidan adalah senyawa yang tidak diproduksi di dalam tubuh dan diperoleh dari makanan seperti vitamin C, vitamin E, selenium, karotenoid, *manganesse*, *zinc*, flavonoid, asam lemak omega-3 dan omega-6, serta masih banyak yang lainnya (Pham-Huy, 2008: 89-96).

E. Trimetilin sebagai Induktor Stres Oksidatif Penyakit Neurogeneratif

Trimetilin (TMT) merupakan produk industri dimetiltin klorida, suatu agen untuk menstabilkan plastik tertentu. Zat ini merupakan organometal yang bersifat neurotoksik yang dapat merusak daerah sistem limbik dan cortex serebral (Balaban, dkk., 1988: 337-361). Berdasarkan eksperimen, TMT telah diketahui dapat menyebabkan degenerasi selektif pada sistem saraf pusat rodensia sehingga menyebabkan kematian saraf secara selektif, menghasilkan astrogliosis reaktif, dan aktivasi mikroglial pada sistem limbik terutama pada

hippocampus (Corvino, dkk., 2005: 471-477; Farghaly dan Abo-Zeid, 2010: 21-27).



Gambar 15. Rumus Bangun Trimetiltilin Klorida

Trimetiltilin meningkatkan pembentukan spesies oksigen reaktif (Shuto, dkk., 2009: 424-436). Pemberian TMT secara sistemik dapat meningkatkan pembentukan radikal hidroksil, malondialdehid, dan karbonil protein hippocampus (Shin, dkk., 2005: 715-727). TMT juga mengganggu sistem serotonergik dan noradrenergik (Ogita dkk, 2004: 619-630). TMT juga dapat menginduksi kaskade apoptosis, mengaktifkan astrosit dan mikroglia, serta menghasilkan sitokin proinflamasi (Buck-Koehntop, dkk., 2005: 652-665). Dosis akut tunggal TMT dapat menginduksi perubahan lapisan sel granula, sedangkan dosis kronik yang lebih rendah dapat memengaruhi daerah sel pyramidal CA1-CA4 (Robertson, Gray, dan Iglesias, 1987: 7-17).

Hasil pengukuran parameter biokimiawi menunjukkan bahwa tikus yang hanya diinjeksi TMT mengalami peningkatan kadar MDA darah, MDA otak, serta terjadi penurunan kadar GSH, aktivitas GPx, SOD, dan katalase. Mekanisme TMT dalam menimbulkan efek toksik belum diketahui seluruhnya dengan pasti (Geloso, Corvino, Michetti, 2011: 729-738). Secara umum, ketoksikan senyawa organotin berkaitan dengan jumlah dan panjang gugus alkil yang terikat pada tin dan memiliki spesifitas yang tinggi pada aksinya di neuron (Dopp,

dkk., 2007: 226-234; Florea, dkk., 2004: 205-219; Snoeij, Penninks, dan Seinen, 1987: 335-353; Winship, 1988: 19-38). Pemberian TMT pada hewan uji terbukti dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa kerusakan neurotoksik akibat induksi TMT dimediasi oleh turunan dari *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) (Clerici, 1996: 236-242; Harry, dkk., 2001: 307-319; Viviani, dkk., 2001: 93-97; Zhang, dkk., 2006: 34-43).

Berdasar pada penelitian Viviani, dkk. (2001: 93-97) dan Zhang, dkk. (2006: 34-43), TMT meningkatkan pembentukan ROS secara *in vitro*, serta *in vivo* yang dibuktikan pada penelitian Ali, Lebel, dan Bondy (1992: 637-648) dan Wang, dkk. (2008: 58-64). Pemberian TMT akan meningkatkan turunan spesies oksidatif seluler pada beberapa jenis *cells line* serta pada hippocampus tikus *Sprague Dawley* (Gunasekar, dkk., 2001: 83-89; Jenkins dan Barone, 2004: 63-73; Mundy dan Freudrich, 2006: 71-81; Robertson, Gray, dan Iglesia, 1987: 7-17).

Tikus yang mendapat injeksi TMT dosis tunggal 8 mg/kgBB menunjukkan adanya peningkatan kadar MDA darah maupun otak. Malondialdehid (MDA) adalah senyawa yang dapat menunjukkan aktivitas radikal bebas di dalam sel sehingga pengukuran kadar MDA dapat digunakan sebagai petunjuk adanya stres oksidatif akibat radikal bebas (Gawel, dkk., 2004: 453-455).

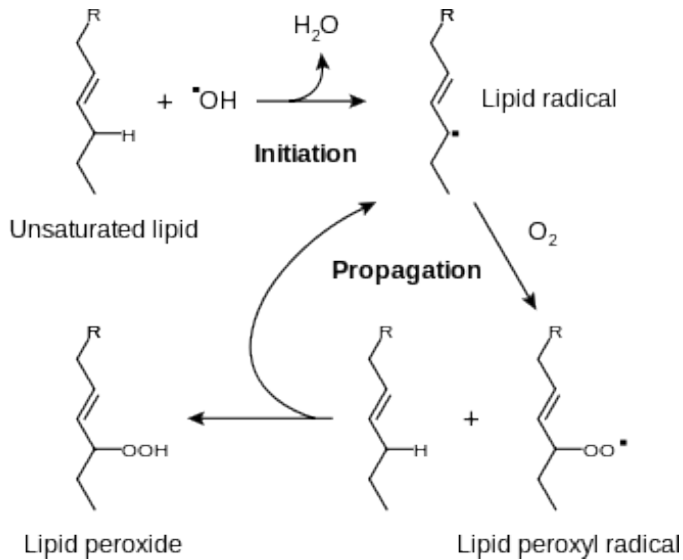
Peningkatan kadar MDA otak disebabkan karena otak merupakan organ yang mudah mengalami stres oksidatif. Otak memiliki aktivitas metabolik yang tinggi. Kandungan asam lemak tidak jenuh otak tinggi, tetapi mekanisme sistem pertahanan antioksidatifnya relatif sedikit dibandingkan organ lain (Panetta dan Clemens, 1994: 239-245; Smith, dkk., 2000: 193-200).

Kerusakan yang diinduksi oleh oksiradikal terhadap makromolekul (lipid, protein, asam nukleat, dan lain-lain) menjadi faktor penting gangguan neurodegeneratif (Liu, dkk., 2001: 1643-1648; Wickens,

2001: 379-391). *Poly Unsaturated Fatty Acid*/PUFA merupakan komponen dari membran sel yang sangat rentan terhadap kerusakan oksidatif. Kerusakan oksidatif dapat disebabkan oleh induksi berbagai spesies reaktif radikal dan non radikal yang meliputi ROS, RNS, dan *reactive aldehydic species* (Weinert dan Timiras, 2003: 1706-1716; Yu, dkk., 2005: 434-441). Radikal bebas oksigen yang paling reaktif di dalam tubuh adalah anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikal ($\cdot OH$), dan hidrogen peroksida (H_2O_2) (McCord, 2000: 652-659).

Kerusakan oksidatif pada membran lipid, disebut peroksidasi lipid, diinisiasi oleh atom hidrogen dari PUFA oleh spesies reaktif. Reaksi ini menghasilkan radikal lipid (L^*), yang selanjutnya dapat menginduksi pembentukan radikal lain. Ini meliputi radikal peroksil lipid (LOO^*), lipid hidroperoksida ($LOOH$), dan radikal alkoksil lipid (Fang, Yang, dan Wu, 2002: 872-879).

Peroksidasi membran lipid dan protein (*carbonyl group formation*) dapat mengganggu fluiditas membran, menurunkan potensial membran, meningkatkan permeabilitas membran terhadap ion yang menginaktifkan enzim yang terikat pada membran seperti Na^+/K^+ -ATPase, sehingga akan menyebabkan terjadinya kematian sel (Farmer dan Mueller, 2013: 429-450). Peroksidasi asam lemak tidak jenuh menghasilkan produk akhir lipid seperti 4-HNE, MDA, akrolein, dan lain-lain (Fang, Yang, dan Wu, 2002: 872-879).



Gambar 16. Peroksidasi Lipid

Sumber: Young dan McEneny (2001: 358)

Senyawa aldehyd [MDA dan 4-hidroksi-2E-nonenal (HNE)] yang dihasilkan dari proses peroksidasi lipid, memiliki reaktivitas yang tinggi dengan kelompok sulfhidril dari sistein, histidine, dan lisin yang merupakan komponen utama enzim neuron seperti Na-K-ATPase (Mark, dkk., 1997: 255-264). ATPase terkait dengan transfer ion dan homeostasis kalsium. Peningkatan konsentrasi kalsium dapat menyebabkan peristiwa kaskade intraseluler yang menghasilkan peningkatan ROS dan kematian seluler (Mattson, 1995: 679-682).

Studi sebelumnya telah melaporkan bahwa pada penderita AD ringan sampai sedang terjadi peningkatan kadar MDA di plasma dan di sel darah merah (Greilberger, dkk., 2008: 633-638; Martín-Aragón, dkk., 2009: 373-378; Zafrilla, 2006: 1075-1083). Penelitian menggunakan hewan uji juga telah membuktikan bahwa pemberian TMT dapat meningkatkan kadar MDA di dalam tubuh (Park, dkk., 2011: 137-143). Peningkatan kadar MDA dan karbonil protein telah dilaporkan menunjukkan adanya peningkatan yang sejalan dengan

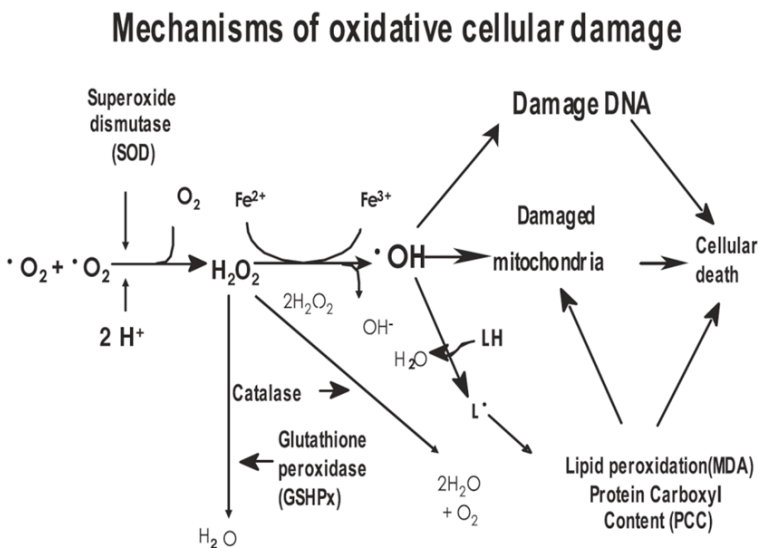
penurunan kapasitas antioksidannya (Mutlu-Türkoğlu, dkk., 2003: 397-400).

Secara normal, organisme akan melakukan mekanisme pertahanan untuk mengeliminasi radikal bebas melalui jalur enzimatik maupun non-enzimatik. Jalur non-enzimatik meliputi senyawa-senyawa yang berperan sebagai protein pengikat metal, penangkap radikal, dan antioksidan seperti glutation (GSH), Co, Mn, Zinc, selenium (Fang, Yang, dan Wu, 2002: 872-879; Knight, 2000:145-158).

Antioksidan GSH merupakan senyawa yang dikenal sebagai substrat untuk berbagai metabolit toksik. GSH dapat mengurangi toksisitas berbagai obat dan senyawa kimia. Glutation tereduksi yang merupakan antioksidan kelompok tiol nonprotein, dapat berperan menjadi *buffer* radikal bebas di otak (Dringen, 2000: 649-671). Glutation disintesis dari glutamat, sistein, dan glisin. N-asetilsistein adalah prekursor sistein untuk sintesis GSH intraseluler. Radikal bebas oksigen akan direduksi oleh GPx menjadi glutation disulfid (GSSG). GSH dibentuk kembali oleh *redox recycling*, dimana GSSG direduksi menjadi GSH oleh glutation reduktase (GR) dengan membutuhkan NADPH. Penurunan kadar GSH dapat mengganggu H_2O_2 clearance sehingga dapat meningkatkan pembentukan radikal $OH\cdot$. Radikal $OH\cdot$ merupakan molekul yang sangat toksik pada otak sehingga dapat menimbulkan kerusakan oksidatif pada otak (Dringen, 2000: 649-671; Sun, 1990: 583-599). Selain itu, GSH dapat bereaksi dengan berbagai senyawa elektrofilik xenobiotik dalam reaksi katalitik dari glutation-S-transferase. GSH juga efektif menangkap ROS, yaitu lipid peroksid radikal, peroksid nitrit, dan H_2O_2 , secara langsung dan tidak langsung. GSH dapat berkonjugasi dengan NO, menghasilkan formasi *S-nitrosoglutathione adduct*, yang akan dipecah oleh sistem tioredoksin untuk melepaskan GSH dan NO. Kemudian, GSH juga berinteraksi dengan glutaredoksin dan tioredoksin (*thiol-proteins*), yang mempunyai peranan penting dalam pengaturan homeostasis *cellular redox* (Javed,

dkk., 2012: 340-352).

Senyawa antioksidan lain di dalam tubuh juga memberikan sistem pertahanan terhadap radikal bebas. SOD bekerja dengan mengubah radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Adapun katalase dan glutathione peroksida bekerja dengan mengkatalisis degradasi H_2O_2 menjadi molekul air dan oksigen (Bild, dkk., 2012: 147-154).



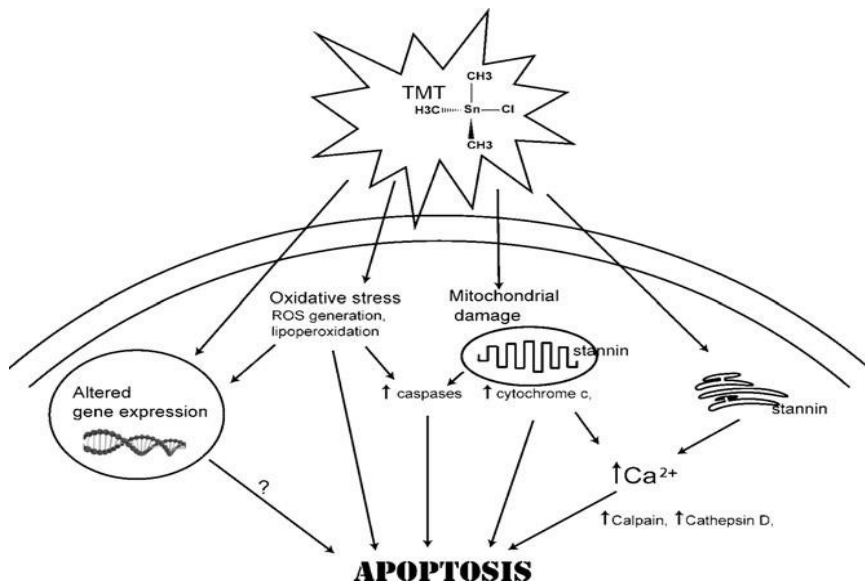
Gambar 17. Mekanisme Pertahanan Antioksidan

Sumber: Munoz dan Castilla-Cortazar (2012)

Pengamatan histologik juga menunjukkan bahwa tikus yang diinjeksi TMT mengalami penurunan volume dan estimasi jumlah sel pyramidal di regio CA1 dan CA2-CA3 hippocampus. Penurunan jumlah sel pyramidal tersebut didukung dengan adanya ekspresi protein *caspase-3* di sitoplasma sel pyramidal di daerah CA1, serta di sitoplasma maupun nukleus sel pyramidal di daerah CA2-CA3 hippocampus yang lebih intensif dibandingkan dengan kelompok normal, yang

menunjukkan bahwa penurunan jumlah sel karena mengalami kematian melalui proses apoptosis. Hasil tersebut juga mendukung hasil penimbangan berat hippocampus, yaitu semua kelompok tikus yang diinjeksi TMT mengalami penurunan berat hippocampus yang signifikan dibandingkan dengan kelompok normal. Dilaporkan oleh Arendt (2009: 167-179) bahwa pada penderita demensia Alzheimer, dimana daerah otak yang berfungsi untuk proses memori, yaitu lobus frontal bagian medial serta hippocampus, ukurannya berkurang. Hal ini terjadi akibat degenerasi sinapsis dan kematian neuron.

TMT dapat mengganggu sistem serotonergik dan kolinergik, mengaktifkan protein kinase C, dan menginduksi *apoptotic cascade* (Pavlovskić, 1995: 2338-2343; Roy, dkk., 1999: 173-176; Thompson, dkk., 1996: 1201-1216). Mekanisme ketoksikan TMT dalam menginduksi terjadinya apoptosis digambarkan oleh Geloso, Corvino, dan Michetti (2011).



Gambar 18. Mekanisme Ketoksikan TMT

Sumber: Geloso, Corvino, dan Michetti (2011)

Kerusakan pada sel yang sensitif terhadap TMT berkaitan dengan stres oksidatif, *calcium overload*, dan kerusakan mitokondria. Kerusakan mitokondria kemungkinan dimediasi oleh protein stannin (SNN), yaitu sebuah protein dengan 88 asam amino yang dikode oleh DNA dari sel yang sensitif terhadap TMT (Buck, dkk., 2004). Stannin dapat ditemukan di jaringan limfe, ginjal, dan saraf dengan ekspresi stannin paling besar berada di limpa, selanjutnya di hippocampus, neocortex, cerebellum, striatum, otak tengah, dan ginjal (Dejneka, 1997: 801-815). SNN kemungkinan terletak di membran luar mitokondria dan membran retikulum endoplasma (Billingsley, dkk., 2006: 243-250; Davidson, dkk., 2004: 855-863). SNN akan mengikat secara langsung dengan dimetilin (hasil demetilasi dari TMT), sehingga menyebabkan pelepasan sitokrom c dan aktivasi berbagai *caspase*. Aktivasi famili *caspase* dari protease sistein dapat memediasi apoptosis yang diinduksi TMT secara *in vivo* (Geloso, dkk., 2002: 152-160). *Calcium overload* terjadi tergantung pada penyimpanan intraseluler yang ada pada mitokondria dan retikulum endoplasma, kemudian menyebabkan aktivasi *Calpain* dan *Cathepsin D* yang akan memicu terjadinya apoptosis (Thompson, dkk., 1996: 1201-1216; Billingsley, dkk., 2006: 243-250).

Penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa analisis imunohistokimia pada irisan otak tikus yang diinduksi TMT dosis 8 mg/kgBB secara intraperitoneal menunjukkan hilangnya ekspresi stannin pada sel pyramidal dan gyrus dentate. Hal ini menunjukkan bahwa ekspresi stannin berkaitan dengan hilangnya sel-sel tersebut akibat induksi TMT (Patanow, Day, dan Billingsley, 1996: 187-202).

Hasil uji stereologi pada hippocampus tikus yang hanya diinjeksi TMT (kelompok KS) menunjukkan bahwa estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 region terjadi penurunan, yaitu sebesar 59,5%. Jumlah tersebut lebih tinggi apabila dibandingkan dengan penurunan yang terjadi di daerah CA2-CA3, yaitu sebesar 49,6%. Selain itu, ekspresi protein *caspase-3* dominan terjadi pada bagian

sitoplasma sel pyramidal di daerah CA1, sedangkan di daerah CA2-CA3 terjadi pada bagian nukleus dan sitoplasma. Perbedaan ini kemungkinan disebabkan karena ada perbedaan kepekaan sel di kedua daerah tersebut terhadap senyawa neurotoksik (Wang dan Michaelis, 2010).

Telah dilaporkan bahwa daerah CA1 memiliki banyak reseptor NMDA (NMDARs) daripada daerah CA3 (Fiacco, dkk., 2003: 350-360; Korbo, dkk., 1996: 359-366). Aktivasi NMDARs akibat stres oksidatif menghasilkan peningkatan kadar Ca^{2+} yang lebih banyak di neuron CA1 daripada di neuron CA3 (Wang dan Michaelis, 2010; Haxaire, 2012: 336-344). Peningkatan kadar Ca^{2+} tersebut dapat menyebabkan eksitotoksisitas glutamat yang akan memicu terjadinya apoptosis sel yang lebih banyak terjadi di daerah CA1 daripada di daerah CA2-CA3 (Lu, dkk., 2014; Quincozes-Santos, 2014: 544-551). Apoptosis neuron ditandai dengan adanya ekspresi *caspase-3*, yaitu suatu enzim anggota *cysteine-aspartic acid protease*, yang berperan pada fase eksekusi apoptosis sel (Alnemri, 1996: 171).

Tikus yang mendapat injeksi TMT menunjukkan lesi yang ekstensif pada Cornu Ammonis (CA), terutama di sel pyramidal daerah CA1 dan CA3 (Geloso, Corvino, dan Michetti, 2011: 729-738; Lattanzi, dkk., 2013; Latini, dkk., 2010: 500-509). Estimasi jumlah total sel pyramidal di daerah CA1 dan CA2-CA3 pada kelompok KS (yang diinjeksi TMT saja) menunjukkan penurunan yang signifikan setelah 28 hari diinjeksi TMT. Penurunan jumlah sel pyramidal pada hari ke-28 tersebut dapat disebabkan oleh sifat ketoksikan tertunda (*delayed toxicity*) dari TMT. Hal ini dimungkinkan karena TMT memiliki afinitas yang tinggi pada hemoglobin (Koczyk, 1996: 587-596). Akibatnya, hemoglobin akan berperan sebagai *reservoir* yang secara perlahan melepaskan TMT ke plasma untuk selanjutnya menuju ke otak (Harry, dkk., 1985: 9-18). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Robertson, Gray, dan Iglesia (1987: 7-17) menunjukkan bahwa

penurunan jumlah sel pyramidal akibat ketoksikan TMT terjadi antara 14 dan 28 hari, sedangkan kerusakan struktural mulai terlihat beberapa hari setelah pemberian TMT, lalu semakin jelas dalam 21 hari dan berlanjut selama beberapa minggu kemudian (Whittington, Woodruff, dan Baisden, 1989: 21-33).

Daftar Pustaka

- Berawi, K. N. dan Desty Marini. (2018). Efektivitas Kulit Batang Bakau Minyak (*Rhizopora apiculata*) sebagai Antioksidan. *J. Agromedicine*, 5 (1): 412–417.
- Badriyah, Lailatul dan Algafari B. Manggara. (2015). Penetapan Kadar Vitamin C pada Cabai Merah (*Capsicum annum l.*) Menggunakan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *J. Widyata*, 2 (1): 26–28.
- Manev, H, T. Uz, A. Kharlamov, J. Y. Joo. (1996). Increased Brain Damage After Stroke Or Excitotoxic Seizures In Melatonin-Deficient Rats. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 10 (13): 1546–1551.
- Nurkhasanah, L. H. Nurani, dan Z. R. Hakim. (2017). Effect of Rosella (*Hibiscus sabdariffa L*) Extract on Glutathione-S-Transferase Activity in Rats. *Tropical Journal Pharmaceutical Research*, 16 (10): 2411–2416.
- Parwata, I Made Oka Adi. (2016). *Antioksidan*. Bahan Ajar. Kimia Terapan Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Halliwell, B. 2015. *Antioxidant and Anti-Inflammatory Components of Foods*. Belgium: ILSI Europe.
- Nurkhasanah, Nanik Sulistyani, dan Ery Fatmawati. (2018). The Increasing of Catalase Activity in Dimethylbenz- α -anthracene (DMBA) Induced Rat Treated by *Hibiscus sabdariffa L* Extract.

- Pak. J. Pharm. Sci.*, 31 (3): 851-856.
- Amarowicz, Ryszard, M. Naczek, dan Fereidoon Shahidi. (2012). Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (9): 957-961.
- Han, Seong-Soo, Seog-Cho Lo, Yong-Wa Choi, dkk. (2004). *Antioxidant Activity of Crude Extract and Pure Compounds of Acer ginnala Max. Bulletin of the Korean Chemical Society*, 25 (3): 389-391.
- Nyoman, Fitri. (2014). Butylated Hydroxyanisole Sebagai Bahan Aditif Antioksidan pada Makanan Dilihat dari Perspektif Kesehatan. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 4 (1): 41-50.
- Aprilia, Vivin, Sigit K. L. Bhima, dan Akhmad Ismail. (2018). Pengaruh Pemberian Butylated Hydroxytoluene (2 , 6-Di- Tert-Butyl-4-Methylphenol) Per Oral Dosis Bertingkat terhadap Gambaran Histopatologis Ginjal. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 7 (2): 1154–1165.
- Panicker, Varuna, Sisilamma George, dan D. Krishna. (2014). Toxicity Study of Butylated Hydroxyl Toluene (BHT) in Rats. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3: 758-763.
- Pérez, Jorge A. Mendoza dan Tomás A. F. Aguilar. (2013). “Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico,” *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role Antioxidants*. doi: 10.5772/52247.
- Puspita, Weni, Nurkhasanah, dan Ika D. Kumalasari. (2018). Yoghurt Fortified Formulation of Lakum Fruit (*Cayratia trifolia (L.) Domin*) Extract as an Antioxidant. *Majalah Obat Tradisional*, 23 (3): 91.
- Nurkhasanah dan Rina Novitasari. (2019). Immunomodulatory Activity of Yogurt Fortified with Honey and Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) on Reactive Oxygen Intermediate (ROI) and Nitric Oxide (NO) Secretion. *Indonesian Journal of Pharmacy*, 30 (2): 141–146.

- Yanuarto, Tri, Nurkhasanah, Laela H. Nurani. (2019). Uji Kadar Antosianin Ekstrak Buah Jamblang (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) pada Formulasi Yoghurt Sebagai Antioksidan. *Jurnal Ilmiah Pharmacy*, 6 (1): 114–127.
- Idris, Nurhasanah. (2011). Analisis Kandungan β -Karoten dan Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Buah Melon (*Cucumis melo* Linn .) secara Spektrofotometri UV-Vis. Skripsi. Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Paramita, Swandari, Meiliati Aminyoto, Sjarif Ismail, dkk. (2019). Anti-hypercholesterolemic Effect of *Zingiber montanum* Extract (Version 2). *FI000Research*, 7 (1798): 1-7. doi: 10.12688/fl000research.16417.2.
- Orobiyi, A., H. Ahissou, F. Gbaguidi, dkk. (2015). Capsaicin and Ascorbic Acid Content in the High Yielding Chili Pepper (*Capsicum annum* L.) Landrace of Northern Benin. *International Journal off Current Microbiology Applied Sciences*, 4 (9): 394-403.
- Rindler, Paul M., Scott M. Plafker, Luke I. Szweda, dkk. (2013). High Dietary Fat Selectively Increases Catalase Expression Within Cardiac Mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 288 (3): 1979-1990. doi: 10.1074/jbc.M112.412890.
- Han, Ah-Reum, Hyunyoung Kim, Donglan Piao, dkk. (2021). Phytochemicals and Bioactivities of *Zingiber cassumunar* Roxb. *Molecules*, 26 (8): 1-18. doi: 10.3390/molecules26082377.
- Buckner, C. A., Lafrenie, Denomme, dkk. (2018). Complementary and Alternative Medicine Use in Patients Before and After Cancer Diagnosis. *Current Oncology*, 25 (4): e275-e281.
- Gusti, Amani M. T., Safaa Y. Qusti, Eida M. Alshammari, dkk. (2021). Antioxidants-Related Superoxide Dismutase (*SOD*), Catalase (*CAT*), Glutathione Peroxidase (*GPX*), Glutathione-S-Transferase (*GST*), and Nitric Oxide Synthase (*NOS*) Gene Variants Analysis

- in an Obese Population: A Preliminary Case-Control Study. *Antioxidants*, 10 (4): 595. doi: 10.3390/antiox10040595.
- Linster, Carole L. dan Emile Van Schaftingen. (2007). "Vitamin C. Biosynthesis, Recycling and Degradation in Mammals," *FEBS J.*, 274 (1): 1-22.
- Corti, Alessandro, A. F. Casini, dan Alfonso Pompella. (2010). Cellular Pathways for Transport and Efflux of Ascorbate and Dehydroascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 500 (2): 107–115,
- Buettner, G. R. dan Jurkiewicz B. (1996). *Chemistry and Biochemistry of Ascorbic Acid*. New York: Marcel Dekker.
- Barkas, Fotios, Tzortzis Nomikos, Evangelos Liberopoulos, dkk. (2020). Diet and Cardiovascular Disease Risk Among Individuals with Familial Hypercholesterolemia: Systematic Review wnd Meta-Analysis. *Nutrients*, 12 (8): 1-22. doi: 10.3390/nu12082436.
- Gill, Sarvajeet Singh dan Narendra Tuteja. (2010). Reactive Oxygen Species and Antioxidant Machinery in Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 48 (12): 909-930.
- Mustafa, Syed Khalid, Atif A. A. Oyouni, Meshari M. H. Aljohani, dkk. (2020). "Polyphenols More Than an Antioxidant: Role and Scope. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14 (1): 47-61. doi: 10.22207/JPAM.14.1.08.
- Febriana, Elma, Tamrin, dan Rh Fitri Faradilla. (2019). Analisis Kadar Polifenol dan Aktivitas Antioksidan yang Terdapat pada Ekstrak Buah : Studi Kepustakaan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*, 8 (1): 21-31.
- Baradaran, Azar, Hamid Nasri, dan M. Rafieian-Kopaei. (2014). "Oxidative Stress and Hypertension. Possibility of Hypertension Therapy with Antioxidants. *J. Res. Med. Sci.*, 19 (4): 358-367.
- Akhlaghi, Masoumeh dan Brian Bandy. (2009). Mechanisms of

- Flavonoid Protection Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 46 (3): 309-317.
- Khanbabae, K. dan T. van Ree. (2001). Tannins: Classification and Definition. *Nat. Prod. Rep.*, 18 (6): 641-649.
- Fennema, Owen R. (1996). *Food Chemistry*. New York: CRC Press.
- Sikder, Kunal, Sanket K. Shukla, Neel Patel, dkk. (2018). High Fat Diet Upregulates Fatty Acid Oxidation and Ketogenesis via Intervention of PPAR- γ . *Cell. Physiol. Biochem.*, 48 (3): 1317-1331. doi: 10.1159/000492091.
- Ihwah, A., P. Deoranto, S. Wijana, dkk. (2018). Comparative Study Between Federer and Gomez Method for Number of Replication in Complete Randomized Design Using Simulation : Study of Areca Palm (*Areca catechu*) as Organic Waste for Producing Handicraft Paper. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 131 (1): 0-6. doi :10.1088/1755-1315/131/1/012049.
- Sitorus, Lungguk, Julius Pontoh, dan Vanda Kamu. (2015). Analisis Beberapa Asam Organik dengan Metode High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Grace Smart Rp 18 5 μ . *Jurnal MIPA Unsrat*, 4 (2): 148-152. doi: 10.35799/jm.4.2.2015.9113.
- Irianti, Tanti T., Kuswandi, Sindu Nuranto, dkk. (2021). *Antioksidan dan Kesehatan*, 2nd ed. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Suryohudoyo, P. (1993). *Oksidan, Antioksidan dan Radikal Bebas*. Surabaya: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.
- Arief, Handy, M. Aris Widodo. (2017). Peranan Stress Oksidatif pada Proses Penyembuhan Luka. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*, 5 (2): 22-29.
- Suryani, Nani, Tinny Endang, dan Aulanni'am. (2013). Pengaruh Ekstrak Metanol Biji Mahoni terhadap Peningkatan Kadar

- Insulin, Penurunan Ekspresi TNF-alfa dan Perbaikan Jaringan Pankreas Tikus Diabetes. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 27 (3): 137-145.
- Cherubini, Antonio, C. Ruggiero, M. C. Polidori, dkk. (2005). Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. *Free Radic. Biol. Med.*, 39 (7): 841-852.
- Rice-Evans, C. A., N.J. Miller, P. G. Bolwell, dkk. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radic. Res.*, 22 (4): 375-383.
- Ioku, K., T. Tsushida, Y. Takei, dkk. (1995). Antioxidative Activity of Quercetin and Quercetin Monoglucosides in Solution and Phospholipid Bilayers. *Biochem. Biophys. Acta*, 42 (11): 99-104.
- Igile, Godwin O., W. Oleszek, M. Jurzysta, dkk. (1994). Flavonoids from *Vernonia amygdalina* and Their Antioxidant Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (11): 2445-2448.
- Weiss, G., G. Werner-Felmayer, E.R. Werner, dkk. (1994). Iron Regulates Nitric Oxide Synthase Activity by Controlling Nuclear Transcription. *J. Exp. Med.*, 180 (3): 969-976.
- Seo, Min Young dan Sun Mee Lee. (2002). Protective Effect of Low Dose of Ascorbic Acid on Hepatobiliary Function in Hepatic Ischemia/Reperfusion in Rats. *J. Hepatol.*, 36 (1): 72-77.
- Buettner, G. R. dan B. A. Jurkiewicz. (1996). Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. *Radiat. Res.*, 145 (5): 532-541.
- Zhang, Fang-Fang, Yi-Fan Zheng, Hui-Juan Zhu, dkk. (2006). Effects of kaempferol and quercetin on cytochrome 450 activities in primarily cultured rat hepatocytes. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 50 (5): 18-22.
- Yao, Hsien-Tsung, Mei-Ning Luo, Lang-Bang Hung, dkk. (2012).

- Effects of Chitosan Oligosaccharides on Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Liver and Kidneys. *Food Chem. Toxicol.*, 50 (5): 1171-1177.
- Hebbar, Vidya, Guoxiang Shen, Rong Hu, dkk. (2005). Toxicogenomics of Resveratrol in Rat Liver. *Life Sci.*, 76 (20): 2299-2314.
- Young, A. J. dan G. M. Lowe. (2001). Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 385 (1): 20-27.
- Schulz, Volker, R. Hansel, dan Varro E. Tyler. (1998). *Rational Phytotherapy: A Physician's Guide to Herbal Medicine*. Berlin, Germany: Springer.
- Chandra, Devina, Raissa Fitri, Natanael Prilius, dkk. (2022). Formulasi Sediaan Krim Ekstrak Akar Ginseng Amerika (*Panax quinquefolius L.*). *Jurnal Teknologi Kesehatan dan Ilmu Sosial*, 4 (1).
- Huang, K. C. (1999). *Pharmacology of Chinese Herbs*. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press.
- Attele, A. S., J. A. Wu, dan C. S. Yuan. (1999). Ginseng Pharmacology: Multiple Constituents and Multiple Actions. *Biochem. Pharmacol.*, 58 (11): 1685-1693.
- Blumenthal, M., A. Goldberg, dan J. Brinckmann. (2000). Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. *Integr. Med. Commun.*, 133 (6): 487.
- Davies, Michael J. dan Roger T. Dean. (1997). *Radical-Mediated Protein Oxidation. From Chemistry to Medicine*. England: Oxford University Press.
- Fang, Ferric C. (2004). Antimicrobial Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Concepts and Controversies. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2 (10): 820-832.
- Valavanidis, Athanasios, T. Vlachogianni, K. Fiotakis, dkk. (2013). Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer:

- Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis Through Reactive Oxygen Species Mechanisms. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10 (9): 3886-3907.
- Schieber, Michael dan Navdeep S. Chandel. (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr. Biol.*, 24 (10): R453-R462.
- Liaudet, Lucas, G. Vassali, dan Pal Pacher. (2009). Role of Peroxynitrite in the Redox Regulation of Cell Signal Transduction Pathways. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, 14 (12): 4809-4814.
- Rahmah, Hilma A., Z. M. Ramadhania, Mutakin, dkk. (2018). Artikel Review : Senyawa Nitrogen Reaktif dan Peranannya dalam Kanker Pankreas. *Farmaka*, 17 (3): 166-172.
- Lee, Jisun, S. Giordano, dan Jianhua Zhang. (2012). Autophagy Mitochondria and Oxidative Stress: Cross-Talk and Redox Signalling. *Biochem. J.*, 441 (2): 532-540.
- Drew, Barry dan C. Leeuwenburgh. (2002). Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *Ann. New York Acad. Sci.*, 959: 66-81.
- Salman, K. A. dan S. Ashraf. (2015). Reactive Oxygen Species: A Link Between Chronic Inflammation and Cancer,” *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 22(2): 42-49.
- Barbusinski, Krzysztof. (2009). “Fenton Reaction Controversy Concerning the Chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering Science*, 16 (3): 309-314.
- Ozcan, A. dan M. Ogun. (2015). Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress: Chapter 3*. doi: 10.5772/59293.
- Lee, J., N. Koo, dan D. B. Min. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*,

3 (1): 21-33.

Sauriasari, Rani. (2006). Mengenal dan Menangkal Radikal Bebas. *Jurnal Sains dan Teknologi*, 2 (2): 183-187.

Slaga, Thomas J., Lea Roosa, Robin Keuneke, dkk. (2005). *The Detox Revolution*. Jakarta: PT. Bhuana Ilmu Populer.

Madhavi, D. L., S. S. Deshpande, dan D. K. Salunkhe. (1995). *Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives*. New York: CRC Press.

Huang, Dejian, Boxin Ou, dan Ronald L. Prior. (2005). The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.

Badarinath, A.V., K. Rao, C. C. Madhusudhana, dkk. (2010). A Review on In-Vitro Antioxidant Methods: Comparisons, Correlations and Considerations. *Int. J. PharmTech Res.*, 2 (2): 1276-1285.

Glazer, A. N. (1990). Phycoerythrin Fluorescence-Based Assay for Reactive Oxygen Species. *Methods Enzymol.*, 186: 161-168.

Prior, Ronald, Ha Hoang, Liwei Gu, dkk. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC (FL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (11): 3273-3279.

Ghiselli, A., M. Serafini, G. Maiani, dkk. (1995). A Fluorescence-based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic. Biol. Med.*, 18 (1): 29-36.

Pisoschi, A. M. dan Georghe P. Negulescu. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochemistry & Analytical Biochemistry*, 1 (1): 1-10.

Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, dkk. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization

- Assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26 (9-10): 1231-1237.
- Rice-Evans, C. A., N. J. Miller, P. G. Bolwell, dkk. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radic. Res.*, 22 (4): 375-383.
- Walker, Richard B. dan Jace D. Everette. (2009). Comparative Reaction Rates of Various Antioxidants with ABTS Radical Cation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4): 1156-1161.
- Seeram, Navindra P., Susanne M. Henning, Yantao Niu, dkk. (2006). Catechin and Caffeine Contents of Green Tea Dietary Supplements and Correlation with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (5): 1599-1603.
- Bors, Wolf, Christa Michel, dan Manfred Saran. (1984). Inhibition of the Bleaching of the Carotenoid Crocin: A Rapid Test for Quantifying Antioxidant Activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 796 (3): 312-319.
- Alamdari, Daryoush H., Stella A. Ordoudi, N. Nenadis, dkk. (2009). Comparison of Prooxidant-antioxidant Capacity. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 12 (2): 158-166.
- Manzocco, Lara, Sonia Clligaris, dan Maria C. Nicoli. (2002). Assessment of Pro-oxidant Activity of Foods by Kinetic Analysis of Crocin Bleaching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (10): 2767-2771.
- Notas, George, Niki Miliaraki, Marilena Kampa, dkk. (2005). Patients with Primary Biliary Cirrhosis Have Increased Serum Total Antioxidant Capacity Measured with the Crocin Bleaching Assay. *World Journal of Gastroenterology*, 11 (27): 4194-4198.
- Tubaro, Franco, Elena Micossi, dan Fulvio Ursini. (1996). The Antioxidant Capacity of Complex Mixtures by Kinetic Analysis of Crocin Bleaching Inhibition. *Journal of the American Oil Chemists'*

- Society*, 73: 173-179.
- Halliwell, B. dan J. J. Gutteridge. (1981). Formation of Thiobarbituric Acid Reactive Substances from Deoxyribose in the Presence of Iron Salts: the Role of Superoxide and Hydroxyl Radicals. *FEBS Lett.*, 128 (2): 347-352..
- Kuchandy, Elizabeth dan M. N. A. Rao. (1990). Oxygen Radical Scavenging Activity of Curcumin. *International Journal of Pharmaceutics*, 58 (3): 237-240.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge, dan O. I. Aruoma. (1987). The Deoxyribose Method: A Simple 'Test Tube' Assay for Determination of Rate Constants for Reaction of Hydroxyl Radicals. *Anal. Biochem.*, 165 (1): 215-219.
- Klein, S. M., G. Cohen, dan A. I. Cederbaum. (1981). Production of Formaldehyde During Metabolism of Dimethyl Sulfoxide by Hydroxyl Radical Generating System. *Biochemistry*, 20 (21): 6006-6012.
- Jayaprakasha, G. K., L. Jaganmohan Rao, dan K. K. Sakariah. (2004). Antioxidant Activities of Flavodin in Different in-Vitro Model Systems. *Bioorganic Med. Chem.*, 12 (19): 5141-5146.
- Ruch, R. J., S. J. Cheng, dan J. E. Klaunig. (1989). Prevention of Cytotoxicity and Inhibition of Intercellular Communication by Antioxidant Catechins Isolated from Chinese Green Tea. *Carcinogenesis*, 10 (6): 1003-1008.
- Ou, Boxin, Maureen Hampsch-Woodill, J. Flanagan, dkk. (2002). Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 50 (10): 2772-2777.
- Apak, Reşat, Kubilay Güçlü, Birsen Demirata, dkk. (2007). Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity

- Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. *Molecules*, 12 (7): 1496-1547.
- Benzie, I. F. dan J. J. Strain. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as A Measure of 'Antioxidant Power' the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1): 70-76.
- Muslikha, Nisa. (2020). *Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode Frap pada Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Jambu Mete (Anacardium occidentale L.)*. Karya Tulis Ilmiah: Sekolah Tinggi Kesehatan Nasional Surakarta
- Zitane, Mohamed. (2017). Periodic Solutions for Non-Autonomous Neutral Functional Differential Equations with Finite Delay. *Acta Mathematica Vietnamica*, 42 (3): 533-550.
- Abuin, E., E. Lissi, P. Ortiz, dkk. (2002). Uric Acin Reaction with DPPH Radical at the Micellar Interface. *Boletin de la Sociedad Chilena de Quimica*, 47 (2): 145-149.
- Manzocco, L., M. Anese, dan M. C. Nicoli. (1998). Antioxidant Properties of Tea Extracts as Affected by Processing. *Leb. Und-Technologie*, 31 (7-8): 694-698.
- Shon, D. H., Y. C. Kim, S. H. Oh, dkk. (2003). Hepatoprotective and Free Radical Scavenging Effects of *Nelumbo nucifera*. *Phytomedicine*, 10 (2-3): 165-169.
- Liyana-Pathirana, C. M. dan Fereidoon Shahidi. (2005). Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum* L.) as Affected by Gastric pH Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7): 2433-2440.
- Astudillo, Luis, G. Schmeda-Hirschmann, J. P. Herrera, dkk. (2000) Proximate Composition and Biological Activity of Chilean Prosopis Species. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 80 (5): 567-573.

- Apak, Reşat, Shela Gorinstein, Volker Böhm, dkk. (2013). Methods of Measurement and Evaluation of Natural Antioxidant Capacity/Activity (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 85: 957-998.
- Bener, M., MOzyurek, K. Guclu, dkk. (2010). Development of A Low-Cost Optical Sensor for Cupric Reducing Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts. *Analytical Chemistry*, 82 (10): 4252-4258.
- Ozyurek, M, K. Guclu, E. Tutem, dkk. (2011). A Comprehensive Review of CUPRAC Methodology. Critical Review. *Analytical Methods*, 3 (11): 2439-2453.
- Apak, R., K. Guclu, M. Ozyurek, dkk. (2008). Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay. *Microchimica Acta*, 160: 413-419.
- Ramadhan, Hafiz, D. Baidah, N. P. Lestari, dkk. (2020). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun, Buah dan Kulit Terap (Artocarpus odoratissimus) Menggunakan Metode Cuprac. *Farmasains Jurnal Ilmiah Ilmu Kefarmasian*, 7 (1): 7-12.
- McDonald, S., P. D. Prenzler, M. Antolovich, dkk. (2001). Phenolic Content and Antioxidant Activity of Olive Extracts. *Food Chemistry*, 73 (1): 73-84.
- Wolfe, Kelly, Xianzhong Wu, dan Rui Hai Liu. (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (3): 609-614.
- Yilridim, Ali, M. Oktay, dan V. Bilaloglu. (2001). The Antioxidant Activity of the Leaves of *Cydonia vulgaris*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 31: 23-27.
- Nurkhasanah. (2015). The Effect of Rosella (*Hibiscus Sabdariffa L*)

- Treatment on IL-10 and IL-14 Secretion on Dimethylbenz (A) Anthracene (DMBA) Induced Rat. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, 7 (4): 402-404.
- Nedeem, M., Islam Ullah Khan, M. Nadeem, dkk. (2007). Evaluation of Antioxidant Activity Using An Improved DMPD Radical Cation Decolourization Assay. *Acta Chimica Slovenica*, 54 (2): 295-300.
- Verde, Veronica, V. Fogliano, A. Ritieni, dkk. (2002). Use of N,N-Dimethyl-P-Phenylenediamine to Evaluate the Oxidative Status of Human Plasma. *Free Radical Research*, 36 (8): 869-873.
- Fogliano, V., V. Verde, G. Randazzo, dkk. (1999). Method for Measuring Antioxidant Activity and Its Application to Monitoring Antioxidant Capacity of Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3): 1035-1040.
- Gupta, Deepshikha. (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (2): 546-566. doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.6(2).546-66.
- Liu, Rui Hai dan John Finley. (2005). Potential Cell Culture Models for Antioxidant Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10): 4311-4314.
- Wolfe, Kelly L. dan Rui Hai Liu. (2007). Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (22): 8896-8907.
- Mensah, Ephraim Mak, G. Komlaga, dan E. O. Terlabi. (2010). Antihypertensive Action of Ethanolic Extract of Imperata Cylindrica Leaves in Animal Models. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 (14): 1486-1491.

- Rafi, M., E. Rohaeti, A. Miftahudin, dkk. (2011). Differentiation of *Curcuma longa*, *Curcuma xanthorrhiza* and *Zingiber cassumunar* by Thin Layer Chromatography Fingerprint Analysis. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11 (1): 71-74. doi: 10.22146/ijc.21423.
- Quiroga, Emma N., Diego A. Sampietro, M. A. Sgariglia, dkk. (2009). Antimycotic Activity of 5'-Prenylisoflavonones of the Plant *Geoffroea decoricans*, Against *Aspergillus* Species. *International Journal of Food Microbiology*, 132 (1): 42-46.
- Samirana, P.O., Taradipta, dan Leliqia. (2017). Penentuan Profil Bioautografi dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus mauritana* Auct. non Lamk.) dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH. *Jurnal Farmasi Udayana*, 6 (2): 18-22.
- Jimenez, A. M. dan M.J. Navas. (2002). Chemiluminescence Methods (Present and Future). *Grasas y Aceites*, 53 (1): 64-75.
- Pham-huy, L. A., H. He, dan C. Pham-huy. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4 (2): 89-96.
- Winarsi, Hery, S. P. M. Wijayanti, dan A. Purwanto. (2012). Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase, Katalase, dan Glutation Peroksidase Wanita Penderita Sindrom Metabolik. *Majalah Kedokteran Bandung*, 44 (1): 7-12. doi: 10.15395/mkb.v44n1.75.
- Wood, Lisa G., D. A. Fitzgerald, A. K. Lee, dkk. (2003). Improved Antioxidant and Fatty Acid Status of Patients with Cystic Fibrosis After Antioxidant Supplementation is Linked to Improved Lung Function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (1): 150-159.
- Winarsi, H., D. Muctadi, F. R. Zakaria. (2004). Respons Hormonal-Imunitas Wanita Premenopause yang Diintervensi Minuman Fungsional Berbasis Susu Skim yang Disuplementasi Isoflavon Kedelai & Zn Sulfat. *J. Teknol. dan Ind. Pangan*, 15: 28-34.

- Sari, Novita, Nurkhasanah, dan Nanik Sulistyani. (2020). The Antioxidant Effect of Bangle (*Zingiber cassumunar*) Rhizome Extract on Superoxide Dismutase (SOD) Activity in Hyperlipidemic Rats. *Res. J. Chem. Environ.*, 24 (1): 78-81.
- Mahfudh, N., Nanik Sulistyani, A. Fatihatul Khoiro, dkk. (2022). Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaves Ethanol Extract Increases Endogenous Antioxidant Activities in Hyperlipidemic Rats. *Sains Malaysiana*, 51 (9): 2873-2883. doi: 10.17576/jsm-2022-5109-11.
- Cullen, J. J., Christine Weydert, M. M. Hinkhouse, dkk. (2003). The Role of Manganese Superoxide Dismutase in the Growth of Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer Research*, 63 (6): 1297-1303.
- Lewis, Anne, Juan Du, Jingru Liu, dkk. (2005). Metastatic Progression of Pancreatic Cancer: Changes in Antioxidant Enzymes and Cell Growth. *Clinical Exp. Metastasis*, 22 (7): 523-532.
- Liu, Jingru, Juan Du, Yuping Zhang, dkk. (2006). Suppression of the Malignant Phenotype in Pancreatic Cancer by Overexpression of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (PhGPx). *Human Gene Therapy*, 17 (1): 105-116.
- Liu, Jingru, M. M. Hinkhouse, W. Sun, dkk. (2006). Redox Regulation of Pancreatic Cancer Cell Growth: Role of Glutathione Peroxidase in the Suppression of the Malignant Phenotype. *Human Gene Therapy*, 15 (3): 239-250.
- Ohkawa, H., N. Onishi, dan K. Yagi. (1979). Assay for Lipid Peroxidation in Animal Tissue by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*, 95 (2): 351-358.
- Davey, Patrick. (2002). *At a Glance Medicine*. Jakarta: EMS.
- Dalle-Donne, Isabella, R. Rossi, R. Colombo, dkk. (2006). Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry*, 52 (4): 601-623.

- Negre-Salvayre, A., N. Auge, V. Ayala, dkk. (2020). Pathological Aspects of Lipid Peroxidation. *Free Radical Research*, 44 (10): 1125-1171.
- Winarsi, Hery. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Janeiro, P., Ana Maria, dan O. Brett. (2004). Cathecin Electrochemical Oxidation Mechanism. *Analytica Chimica Acta*, 518 (1-2): 109-115.
- Rizki, M. I., Nurkhasanah, T. Yuwono, dkk. (2017). Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences Antioxidant Activity Of Nanoparticle From Rosella (Hibiscus sabdariffa L) Calyx Extract Originated Indonesia And Thailand. *Research Journal of Pharmeceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8 (1S): 149-157.
- König, D., dkk. (2002). Exercise and Oxidative Stress: is There a Need for Additional Antioxidant. *Osterr. Fur Sport.*, 3: 6-15.
- Al-Fawaeir, Saad, E. Özgür Akgül, Tuncer Cayci, dkk. (2011). Comparison of Two Methods for Malondialdehyde Measurement. *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 2 (2): 11-14. doi: 10.4328/JCAM.209.
- Ulfah, M. dan A. P. Wahyuningrum. (2010). Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Kelopak Bunga (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) Terhadap Kadar HDL Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar Hiperlipidemia. *Skripsi*. Semarang.
- Wang, Shou-Chieh, Shiow-Fen Lee, Chau-Jong Wang, dkk. (2011). Aqueous Extract from Hibiscus sabdariffa Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3gamma in an Experimental Animal Model. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, p. 9.
- Vanzella, C., Paula Bianchetti, S. Sbarani, dkk. (2012). Antidepressant-like effects of methanol extract of Hibiscus tiliaceus flowers in

- mice. *BMC Complement. Altern. Med.*, 12: 41.
- Anokwuru, C. P., I. Esiaba I., O. Ajibaye, dkk. (2011). Polyphenolic Content and Antioxidant Activity of *Hibiscus sabdariffa* Calyx. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5 (5): 557-566, 2011.
- Tsai Pi-Jen, John McIntosh, P. Pearce, dkk. (2002). Anthocyanin and Antioxidant Capacity in Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Extract. *Food Research International*, 35 (4): 351-356.
- Mahadevan, N., Shivali, dan P. Kamboj. (2009). *Hibiscus sabdariffa* Linn: An Overview. *Natural Product Radiance*, 8 (1): 77-83.
- Alfian, Riza dan Hari Susanti. (2012). Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 2 (1): 73-80.
- Mathur, Manish dan Govind Vyas. (2013). Role of Nanoparticles Form Production of Smart Herbal Drug-An Overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 4 (4): 329-338.
- Mun'im, Abdul, E. Hanani, dan A. Mandasari. (2008). Pembuatan Teh Herbal Campuran Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dan Herba Seledri (*Apium graveolens*). *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 5 (1): 47-54.
- Simbolon, Rohana Oktofariday. (2011). Karakterisasi Simplisia, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tumbuhan "Rosella" (*Hibicus sabdariffa* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Esherichia coli*. Skripsi: Universitas Sumatera Utara.
- Kumar, Manish, Rajneesh Garg, dan Rakesh Garg. (2012). Phytochemical Properties and Antioxidant Activity of *Hibiscus sabdariffa* Linn. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 1 (3): 1236-1240.
- Devasagayam, T. P. A., K. K. Bloor, dan T. Ramasarma. (2003).

- Methods for Estimating Lipid Peroxidation: An Analysis of Merits and Demerits. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 40 (5): 300-308.
- Neliyanti dan Nora Idiawati. (2014). Ekstraksi dan Uji Stabilitas Zat Warna Alami dari Buah Lakum (*Cayratia trifolia* (L.) Domin),” *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 3 (2): 86-93.
- Yeo, C. K., W. F. Ang, A. F. S. L. Lok, dkk. (2012). *Cayratia* Juss. (Vitaceae) of Singapore: With A Special Note on *Cayratia japonica* (Thunb.) Gapnep. *Nature Singapore*, 5: 331-338.
- Widhiana, E.T., N. Fitriana, Neliyanti, dkk. (2012). Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Buah Lakum (*Vitis diffusa*) dalam Berbagai Fraksi Khas Kalimantan Barat. *Res. Rep.*
- Mohamed, A.G., A.F. Zayan, Nadia, dkk. (2014). Physiochemical and Sensory Evaluation of Yoghurt Fortified with Dietary Fiber and Phenolic Compounds. *Life Science Journal*, 11 (9): 816-822.
- Kumar, D., J. Gupta, S. Kumar, dkk. (2012). Pharmacognostic Evaluation of *Cayratia trifolia* (Linn.) Leaf. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2 (1): 6-10.
- Muhsinin, Soni. (2016). Formulasi Produk Minuman Probiotik (Yoghurt) dari Sari Jagung Manis (*Zea mays* L.) dengan Penambahan Bakteri Probiotik *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. *Jurnal Farmasi Galenika*, 3 (1): 2406-0299.
- Pereira, Eliana, Lillian Barros, dan Isabel C.F.R. Ferreira. (2013). Relevance of the Mention of Antioxidant Properties in Yoghurt Labels: In Vitro Evaluation and Chromatographic Analysis. *Antioxidants*, 2 (2): 62-76.
- Widagdha, Satriyananda dan Fithri Choirun Nisa. (2015). Pengaruh Penambahan Sari Anggur (*Vitis vinifera* L.) dan Lama Fermentasi terhadap Karakteristik Fisika Kimia Yoghurt. *Jurnal Pangan dan*

- Agroindustri*, 3 (1): 248-258.
- Mulyani, Sri, Nur Fajariyah, dan Pratiwi. (2016). Profil Kadar Protein, Kadar Lemak, Keasaman, dan Organoleptik Soyghurt Kulit Buah Pisang Raja (*Musa textillia*) pada Variasi Suhu dan Waktu Fermentasi. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*, 1 (2): 48-57.
- Karam, Isam, Ya Jun Yang, dan Jian Yong Li. (2017). Hyperlipidemia Background and Progress. *SM Atherosclerosis Journal*, 1 (1): 1-8.
- Agustin. (2016). *Penelusuran Fraksi Aktif Anti Oksidan Ekstrak Etanol Rimpang Bangle (Zingiber cassumunar Roxb) dengan Metode DPPH*. Universitas Ahmad Dahlan.
- Bouayed, Jaouad dan Torsten Bohn. (2010). Exogenous Antioxidants-Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidate Medicine and Cellular Longevity*, 3 (4): 228-237.
- Nurkhasanah, R. D. Santoso, dan R. Fauziah. (2017). The Immunomodulatory Effect of *Zingiber cassumunar* Ethanolic Extract on Phagocytic Activity, Nitrit Oxide and Reactive Oxygen Intermediate Secretions of Macrophage in Mice. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 259 (1). doi: 10.1088/1757-899X/259/1/012007.
- Padmasri, P. D., K. W. Astuti, dan N. K. Warditiani. (2013). Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 2 (4): 1-7.
- Islam, S., M. Yoshimoto, K. Ishiguro, dkk. (2003). Bioactive Compounds in *Ipomoea batatas* Leaves. *Proc XXVI IHC - Issues and Advances in Postharvest Hort*, pp. 693-699. doi: 10.17660/ActaHortic.2003.628.88.
- Meira, Marilena, Eliezer P. da Silva, Jorge M. David, dkk. (2012). Review of the Genus *Ipomoea*: Traditional Uses, Chemistry

- and Biological Activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosia*, 22 (3): 682-713.
- Rumbaoa, Rowena G. O., Djana F. Cornago, dan Inacrist M. Geronimo. (2009). Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Philippine Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) Varieties. *Food Chemistry*, 113 (4): 1133-1138.
- Heriwijaya, I Pande Putu D., I Made Jawi, dan Bagus Komang Satriyasa. (2020). Uji Efektivitas Ekstrak Air daun Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas*) terhadap Profil Lipid Tikus Putih Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Pakan Dislipidemia. *Intisari Sains Medis*, 11 (2): 452-456.
- Kurata, R., Tooru Kobayashi, T. Ishii, dkk. (2017). Influence of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Leaf Consumption on Rat Lipid Metabolism. *Food Science and Technology Research*, 23 (1): 57-62.
- Chen, Wei-Ping, Tong-Jun Mao, Lin Fan, dkk. (2011). Effect of Purple Sweet Potato on Lipid Metabolism and Oxidative Stress in Hyperlipidemic Rats. *Journal of Zhejiang University Medical Sciences*, 40 (4): 360-364.
- Dedov, I. I., Shestakova M.V., dkk. (2019). *Algorithms of Specialized Medical Care for Patients with Diabetes Mellitus*. Moscow, Russian.
- Sies, Helmut. (2020). *Oxidative Stress: Eustress and Distress*. Academic Press.
- Sies, Helmut dan Dean P. Jones. (2020). Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21 (7): 363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- Forrester, Steven J., Daniel S. Kikuchi, Marina S. Hernandez, dkk. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation Research*, 122 (6): 877-902. doi: 10.1161/

CIRCRESAHA.117.311401.

- Yang, Hui, Xun Jin, Christopher Wai Kei Lam, dkk. (2011). Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49 (11): 1773-1782.
- Sifuentes-Franco, Sonia, F. P. Pacheco-Moises, A. D. Rodriguez-Carrizalez, dkk. (2017). The Role of Oxidative Stress, Mitochondrial Function, and Autophagy in Diabetic Polyneuropathy. *Journal of Diabetes Research*, vol. 2017, p. 1673081.
- Ozougwu, Jevas C. (2016). The Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Oxidative Stress. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, 3 (6): 1-8.
- Mironczuk-Chodakowska, Iwona, A. M. Witkowska, dan M. E. Zujko. (2018). Endogenous Non-Enzymatic Antioxidants in the Human Body. *Advances in Medical Sciences*, 63 (1): 68-78.
- Bigagli, Elisabetta dan Maura Lodovici. (2019). Circulating Oxidative Stress Biomarkers in Clinical Studies on Type 2 Diabetes and Its Complications. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2019: 5953685.
- Ighodaro, Osasenaga M. (2018). Molecular Pathways Associated with Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 108: 656-662.
- Mahadev, Kalyankar, H. Motoshima, X. Wu, dkk. (2004). The NAD(P) H Oxidase Homolog Nox4 Modulates Insulin Stimulated Generation of H₂O₂ and Plays an Integral Role in Insulin Signal Transduction. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (5): 1844-1854.
- Nass, Norbert, K. Vogel, B. Hofmann, dkk. (2010). Glycation of PDGF Results in Decreased Biological Activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42 (5): 749-754.

- Goh, Su-Yen dan Mark E. Cooper. (2008). The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93 (4): 1143-1152.
- Eriksson, Jan W. (2007). Metabolic Stress in Insulin's Target Cells Leads to ROS Accumulation - A Hypothetical Common Pathway Causing Insulin Resistance. *FEBS Letters*, 581 (19): 3734-3742.
- Morino, K., K. F. Petersen, dan G. I. Shulman. (2006). Molecular Mechanisms of Insulin Resistance in Human and Their Potential Links with Mitochondrial Dysfunction. *Diabetes*, 55 (Suppl 2): S9-S15.
- Hurrle, Samantha dan Walter H. Hsu. (2017). The Etiology of Oxidative Stress in Insulin Resistance. *Biomedical Journal*, 40 (5): 257-262.
- Evans, Joseph L., Betty A. Maddux, dan Ira D. Goldfine. (2005). The Molecular Basis for Oxidative Stress-Induced Insulin Resistance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7 (7-8): 1040-1050.
- Ighodaro, Osasenaga M., Abiola M. Adeosun, dan O. A. Akinloye. (2018). Review Alloxan-Induced Diabetes, A Common Model for Evaluating the Glycemic Control Potential of Therapeutic Compounds and Plants Extracts in Experimental Studies," *Medicina (B. Aires)*, 210: 1-10.
- Goyal, Sameer N., N. M. Reddy, K. R. Patil, dkk. (2016). Challenges and Issues with Streptozotocin-Induced Diabetes-A Clinically Relevant Animal Model to Understand the Diabetes Pathogenesis and Evaluate Therapeutics. *Chemico-Biological Interactions*, 244: 49-63.
- Deeds, M. C., J. M. Anderson, A. S. Armstrong, dkk. (2011). Single Dose Streptozotocin-Induced Streptozotocin-Induced Diabetes: Considerations for Study Design in Islet Transplantation Models.

- Laboratory Animals*, 45 (3): 131-140.
- Sivakumar, V. dan S. Rajeshkumar. (2015). Protective Effect Of *Andrographis Paniculata* On Hyperglycemic Mediated Oxidative Damage In Renal Tissues Of Diabetic Rats. *The Journal of Phytopharmacology*, 4 (6): 287-294.
- Kim, Sung Hee, Sun Hee Hyun, dan Se Young Choung. (2006). Anti-Diabetic Effect of Cinnamon Extract on Blood Glucose in Db/Db Mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1-2): 119-123.
- Gilbert, D. L. (2000). Fifty Years of Radical Ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 1-4.
- Riley, P. A. (1994). Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 65 (1): 27-33.
- Kato, M., M. Kamigaito, M. Sawamoto, dkk. (1995). Polymerization of Methyl Methacrylate with the Carbon Tetrachloride/ Dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(II)/ Methylaluminum Bis(2,6-ditert-butylphenoxide) Initiating System: Possibility of Living Radical Polymerization. *Macromolecules*, 28 (5): 1721-1723.
- Murray, Robert K., D. K. Granner, P. A. Mayes, dkk. (2006). *Harper's Illustrated Biochemistry (Harper's Biochemistry) (27th ed.)*. McGraw-Hill Medical.
- Inoue, M., Eisuke F. Sato, M. Nishikawa, dkk. (2003). Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Current Medicinal Chemistry*, 10 (23): 2495-2505.
- Pham-Huy, L. A., Hua He, dan Chuong Pham-Huy. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science*, 4 (2): 89-96.
- Birben, E., U. M. Sahiner, C. Sackesen, dkk. (2012). Oxidative Stress

- and Antioxidant Defense. *The World Allergy Organization Journal*, 5 (1): 9-19.
- Fang, Yun-Zhong, Sheng Yang, dan Guoyao Wu. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18 (10): 872-879.
- Lopaczynski, Wlodek dan Steven H. Zeisel. (2001). Antioxidants, programmed cell death, and cancer. *Nutrition Research*, 21 (1-2): 295-307.
- Batish, D. R., H. P. Singh, N. Setia, dkk. (2006). 2-Benzoxazolinone (BOA) Induced Oxidative Stress, Lipid Peroxidation and Changes in Some Antioxidant Enzyme Activities in Mung Bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44 (11-12): 819-827.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, dkk. (2006). Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer. *Chemico-biological Interactions*, 160 (1): 1-40. doi: 10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Cheeseman, K. H. dan T. F. Slater. (1993). An Introduction to Free Radical Biochemistry. *British Medical Bulletin*, 49 (3): 481-493.
- Anthonymuthu, T. S., E. M. Kenny, dan H. Bayr. (2016). Therapies Targeting Lipid Peroxidation in Traumatic Brain Injury. *Brain Research*, 1640 (Pt A): 57-76.
- McCord, J. M. (2000). The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *The American Journal of Medicine*, 108 (8): 652-659.
- Desai, S. N., F. F. Farris, dan S. D. Ray. (2014). Lipid Peroxidation. *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier: 89-93.
- Murray, A. R., E. Kisin, S. S. Leonard, dkk. (2009). Oxidative Stress and Inflammatory Response in Dermal Toxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Toxicology*, 257 (3): 161-171.
- Gurr, M. I. dan A. T. James. (1980). *Lipid Biochemistry: An Introduction*. Netherlands: Springer.

- Markesbery, W. R. (1997). Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 23 (1): 134-147.
- Gabbita, S. P., M. A. Lovell, dan W. R. Markesbery. (1998). Increased Nuclear DNA Oxidation in the Brain in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 71 (5): 2034-2040.
- Mark, R. J., M. A. Lovell, W. R. Markesbery, dkk. (1997). A Role for 4-Hydroxynonenal, an Aldehydic Product of Lipid Peroxidation, in Disruption of Ion Homeostasis and Neuronal Death Induced by Amyloid β -Peptide. *Journal of Neurochemistry*, 68 (1): 255-264.
- Mattson, M. P. (1995). Free Radicals and Disruption of Neuronal Ion Homeostasis in AD: A Role for Amyloid β -Peptide. *Neurobiology of Aging*, 16 (4): 679-682.
- Powers, S. K. dan Malcom J. Jackson. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol. Rev.*, 88 (4): 1243-1276.
- Finaud, Julien, G. Lac, dan E. Filaire. (2006). Oxidative Stress: Relationship with Exercise and Training. *Sports Medicine*, 36 (4): 327-358.
- Paravicini, Tamara M. dan Rhian M. Touyz. (2008). NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension Clinical Implications and Therapeutic Possibilities. *Diabetes Care*, 31 (Suppl 2): S170-S180.
- Jenner, Peter. (2003). Oxidative Stress in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology*, 53 (S3): S26-S36.
- Sayre, L. M., M. A. Smith, dan G. Perry. (2001). Chemistry and Biochemistry of Oxidative Stress in Neurodegenerative Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 8 (7): 721-738.
- Dhalla, N. S., R. M. Temsah, dan T. Netticadan. (2000). Role of Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases. *Journal of*

- Hypertension*, 18 (6): 655-673.
- Kašparová, S., V. Brezová, M. Valko, dkk. (2005). Study of the Oxidative Stress in a Rat Model of Chronic Brain Hypoperfusion. *Neurochemistry International*, 46 (8): 601-611.
- Asami, S., H. Manabe, J. Miyake, dkk. (1997). Cigarette Smoking Induces an Increase in Oxidative DNA Damage, 8-Hydroxydeoxyguanosine, in a Central Site of the Human Lung. *Carcinogenesis*, 18 (9): 1763-1766.
- Dut, R., E. A. Dizdar, E. Birben, dkk. (2008). Oxidative Stress and Its Determinants in the Airways of Children with Asthma. *Allergy*, 63 (12): 1605-1609.
- Grotto, D., L. Santa Maria, J. Valentini, dkk. (2009). Importance of the Lipid Peroxidation Biomarkers and Methodological Aspects FOR Malondialdehyde Quantification. *Quimica Nova*, 32 (1): 169-174.
- Panetta, J. A. dan J. A. Clemens. (1994). Novel Antioxidant Therapy for Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. *Annals New York Academy of Sciences*, 723 (1): 239–245, 1994.
- Siswonoto, Susilo. (2008). *Hubungan Kadar Malondialdehid Plasma dengan Keluaran Klinis Stroke Iskemik Akut*. Tesis: Universitas Diponegoro.
- Morita, M., N. Ishida, K. Uchiyama, dkk. (2012). Fatty Liver Induced by Free Radicals and Lipid Peroxidation. *Free Radical Research*, 46 (6): 758-765.
- Hensley, K., N. Hall, R. Subramaniam, dkk. (1995). Brain Regional Correspondence Between Alzheimer's Disease Histopathology and Biomarkers of Protein Oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65 (5): 2146-2156.
- Rahman, Khalid. (2007). Studies on free Radicals, Antioxidants, and Co-Factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2 (2): 219-236.

- Kharrazi, Hadi, A. Vaisi-Raygani, Z. Rahimi, dkk. (2008). Association Between Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Defense Mechanism with Apolipoprotein E Genotypes in Alzheimer Disease. *Clinical Biochemistry*, 41 (12): 932-936.
- Butterfield, D. Allan, A. Castegna, C. M. Lauderback, dkk. (2002). Evidence that Amyloid Beta-Peptide-Induced Lipid Peroxidation and Its Sequelae in Alzheimer's Disease Brain Contribute to Neuronal Death. *Neurobiology of Aging*, 23 (5): 655-664.
- Ceriello, Antonio. (2008). Possible Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hypertension. *Diabetes Care*, 31 (Supplem 2): S181-S184.
- Gandhi, Sonia dan Andrey Y. Abramov. (2012). Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2012/428010>.
- Bahoran, T., M. A. Soobrattee, V. Luximon-Ramma, dkk. (2006). Free Radicals and Antioxidants in Cardiovascular Health and Disease. *Internet Journal of Medical Update - EJOURNAL*, 1 (2): 24-40.
- Dröge, Wulf. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82 (1): 47-95.
- Genestra, Marcelo. (2007). Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signaling*, 19 (9): 1807-1819.
- Halliwell, Barry. (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life *Plant Physiology*, 141 (2): 312-322.
- Willcox, Joye K., Sarah L Ash, dan G. L. Catignani. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44 (4): 275-295.
- Balaban, C. D., J. P. O. Callaghan, dan M. L. Billingsle. (1988).

- Trimethyltin-Induced Neuronal Damage in the Rat Brain: Comparative Studies Using Silver Degeneration Stains, Immunocytochemistry and Immunoassay for Neuronotypic and Gliotypic Proteins. *Neuroscience*, 26 (1): 337-361.
- Corvino, V., M. C. Geloso, V. Cavallo, dkk. (2005). Enhanced Neurogenesis During Trimethyltin-Induced Neurodegeneration in the Hippocampus of the Adult Rat. *Brain Research Bulletin*, 65 (6): 471-477.
- Farghaly, Ayman A. dan Mona A. M. Abo-Zeid. (2010). Evaluation of the Antimutagenic Effect of Vitamin C against DNA Damage and Cytotoxicity Induced By Trimethyltin in Mice. *Researcher*, 2 (1): 21-27.
- Shuto, Makoto, Kei Higuchi, Chie Sugiyama, dkk. (2009). Endogenous and Exogenous Glucocorticoids Prevent Trimethyltin From Causing Neuronal Degeneration of the Mouse Brain In Vivo: Involvement of Oxidative Stress Pathways. *Journal of Pharmacological Sciences*, 110 (4): 424-436.
- Shin, E.-J., S. K. Suh, Y. K. Lim, dkk. (2005). Ascorbate Attenuates Trimethyltin-Induced Oxidative Burden and Neuronal Degeneration in the Rat Hippocampus by Maintaining Glutathione Homeostasis. *Neuroscience*, 133 (3): 715-727.
- Ogita, K., Y. Nitta, Mami Watanabe, dkk. (2004). In Vivo Activation of c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Cascade Prior to Granule Cell Death Induced by Trimethyltin in the Dentate Gyrus of Mice. *Neuropharmacology*, 47 (4): 619-630.
- Buck-Koehntop, B. A., A. Mascioni, J.J. Buffy, dkk. (2005). Structure, Dynamics, and Membrane Topology of Stannin: A Mediator of Neuronal Cell Apoptosis Induced by Trimethyltin Chloride. *Journal of Molecular Biology*, 354 (3): 652-665.
- Robertson, D. G., R.H. Gray, dan F.A. de la Iglesia. (1987).

- Quantitative Assessment of Trimethyltin Induced Pathology of the Hippocampus. *Toxicologic Pathology*, 15 (1): 7-17.
- Geloso, Maria C., V. Corvino, dan F. Michetti. (2011). Trimethyltin-Induced Hippocampal Degeneration as a Tool to Investigate Neurodegenerative Processes. *Neurochemistry International*, 58 (7): 729-738.
- Dopp, E., L. M. Hartmann, U. von Recklinghausen, dkk. (2007). The Cyto- and Genotoxicity of Organotin Compounds is Dependent on the Cellular Uptake Capability. *Toxicology*, 232 (3): 226-234.
- Florea, A.-M., E. Dopp, G. Obe, dkk. (2004). Genotoxicity of Organometallic Species. *Organic Metal and Metalloid Species in the Environment*. Springer Berlin Heidelberg.
- Snoeij, N.J., A. H. Penninks, dan W. Seinen. (1987). Biological Activity of Organotin Compounds—An Overview. *Environmental Research*, 44 (2): 335-353.
- Winship, K. A. (1988). Toxicity of Tin and Its Compounds. *Adverse Drug Reaction and Acute Poisoning Review*, 7 (1): 19-38.
- Clerici, W.J. (1996). Effects of Superoxide Dismutase and U74389G on Acute Trimethyltin-Induced Cochlear Dysfunction. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 136 (2): 236-242.
- Harry, G. J., R. Sills, M. J. Schlosser, dkk. (2001). Neurodegeneration and Glia Response in Rat Hippocampus Following Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME). *Neurotoxicity Research*, 3 (3): 307-319.
- Viviani, B., E. Corsini, M. Pesenti, dkk. (2001). Trimethyltin-Activated Cyclooxygenase Stimulates Tumor Necrosis Factor- α Release from Glial Cells through Reactive Oxygen Species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172 (2): 93-97.
- Zhang, L., L. Li, K. Prabhakaran, dkk. (2006). Trimethyltin-Induced

- Apoptosis is Associated with Upregulation of Inducible Nitric Oxide Synthase and Bax in a Hippocampal Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216 (1): 34-43.
- Ali, S. F., C. P. LeBel, dan S. C. Bondy. (1992). Reactive Oxygen Species Formation as a Biomarker of Methylmercury and Trimethyltin Neurotoxicity. *Neurotoxicology*, 13 (3): 637-648.
- Wang, Xinli, Jiali Cai, Jiliang Zhang, dkk. (2008). Acute Trimethyltin Exposure Induces Oxidative Stress Response and Neuronal Apoptosis in *Sebastiscus Marmoratus*. *Aquatic Toxicology*, 90 (1): 58-64.
- Gunasekar, P., L. Li, K. Prabhakaran, dkk. (2001). Mechanisms of the Apoptotic and Necrotic Actions of Trimethyltin in Cerebellar Granule Cells. *Toxicology Sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 64 (1): 83-89.
- Jenkins, Scott M. dan Stanley Barone. (2004). The Neurotoxicant Trimethyltin Induces Apoptosis Via Caspase Activation, p38 Protein Kinase, and Oxidative Stress in PC12 Cells. *Toxicology Letters*, 147 (1): 63-72.
- Mundy, William R. dan T. M. Freudenrich. (2006). Apoptosis of cerebellar granule cells induced by Organotin Compounds Found in Drinking Water: Involvement of MAP Kinases. *Neurotoxicology*, 27 (1): 71-81.
- Gaweł, Stefan, Maria Wardas, E. Niedworok, dkk. (2004). Malondialdehyde (MDA) as a Lipid Peroxidation Marker. *Wiadomosci Lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)*, 57 (9-10): 453-455.
- Smith, T. E., J. W. Hull, L. M. Israel, dkk. (2000). Insight, Symptoms, and Neurocognition in Schizophrenia and Schizoaffective Disorder. *Schizophrenia Bulletin*, 26 (1): 193-200.
- Liu, S. X., M. Athar, I. Lippai, dkk. (2001). Induction of Oxyradicals by

- Arsenic: Implication for Mechanism of Genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (4): 1643-1648.
- Wickens, A. P. (2001). Ageing and the Free Radical Theory. *Respiration Physiology*, 128 (3): 379-391.
- Weinert, Brian T. dan Poala S. Timiras. (2003). Invited Review: Theories of Aging. *Physiology*, 95 (4): 1706-1716.
- Yu, Jianchun, Cunzhi Liu, Xuezhong Zhang, dkk. (2005). Acupuncture Improved Cognitive Impairment Caused by Multi-Infarct Dementia in Rats. *Physiology & Behavior*, 86 (4): 434-441.
- Farmer, Edward E. dan Martin J. Mueller. (2013). ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 64 (1): 429-450.
- Young, I. S. dan J. McEneny. (2001). Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis. *Biochemical Society Transactions*, 29 (2): 358-362.
- Greilberger, J., C. Koidl, M. Greilberger, dkk. (2008). Malondialdehyde, Carbonyl Proteins and Albumin-Disulphide as Useful Oxidative Markers in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Free Radical Research*, 42 (7): 633-638.
- Martín-Aragón, Sagrario, Paloma Bermejo-Bescós, Juana Benedí, dkk. (2009). Metalloproteinase's Activity and Oxidative Stress in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *Neurochemical Research*, 34 (2): 373-378.
- Zafrilla, P., J. Mulero, J. M. Xandri, dkk. (2006). Oxidative Stress in Alzheimer Patients in Different Stages of the Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 13 (9): 1075-1083.
- Park, Hyun-Jun, Hyun Soo Shim, Woong Ki Choi, dkk. (2011). Neuroprotective Effect of *Lucium chinense* Fruit on Trimethyltin-Induced Learning and Memory Deficits in the

- Rats. *Exp. Neurobiol.*, 20 (3): 137-143.
- Mutlu-Türkoğlu, Ümit, Ebru İlhan, Serdar Öztezcan, dkk. (2003). Age-Related Increases in Plasma Malondialdehyde and Protein Carbonyl Levels and Lymphocyte DNA Damage in Elderly Subjects. *Clinical Biochemistry*, 36 (5): 397-400.
- Knight, J. A. (2000). Review: Free Radicals, Antioxidants, and the Immune System. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 30 (2): 145-158.
- Dringen, Ralf. (2000). Metabolism and Functions of Glutathione in Brain. *Progress in Neurobiology*, 62 (6): 649-671.
- Sun, Y. (1990). Free Radicals, Antioxidant Enzymes, and Carcinogenesis. *Free Radical Biology Medicine*, 8 (6): 583-599.
- Javed, H., M. M. Khan, A. Ahmad, dkk. (2012). Rutin Prevents Cognitive Impairments by Ameliorating Oxidative Stress and Neuroinflammation in Rat Model of Sporadic Dementia of Alzheimer Type. *Neuroscience*, 210: 340-352.
- Bild, Walther, Alin Ciobica, Manuela Padurariu, dkk. (2012). The Interdependence of the Reactive Species of Oxygen, Nitrogen, and Carbon. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 69 (1): 147-154.
- Munoz, Ursula dan Inma Castilla-Cortazar. (2012). Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions”. *Antioxidant Enzyme*. Intechopen.
- Arendt, T. (2009). Synaptic Degeneration in Alzheimer’s Disease. *Acta Neuropathologica*, 118 (1): 167-179.
- Pavlaković, G., M. D. Kane, C. L. Eyer, dkk. Activation of Protein Kinase C by Trimethyltin: Relevance to Neurotoxicity. *Journal of Neurochemistry*, 65 (5): 2338-2343.
- Roy, A., A. K. Agrawal, R. Husain, dkk. (1999). Cholinergic and Serotonergic Alterations in the Rat Hippocampus Following

- Trimethyltin Exposure and Fetal Neural Transplantation. *Neuroscience Letters*, 259 (3): 173-176.
- Thompson, T. A., J. M. Lewis, N. S. Dejneka, dkk. (1996). Induction of Apoptosis by Organotin Compounds in Vitro: Neuronal Protection with Antisense Oligonucleotides Directed Against Stannin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276 (3): 1201-1216.
- Buck, Bethany A., A. Mascioni, C. J. Cramer, dkk. (2004). Interactions of Alkyltin Salts with Biological Dithiols: Dealkylation and Induction of a Regular β -Turn Structure in Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (44): 14400-14410.
- Dejneka, N. S., C. M. Patanow, R. Polavarapu, dkk. (1997). Localization and Characterization of Stannin: Relationship to Cellular Sensitivity to Organotin Compounds. *Neurochemistry International*, 31 (6): 801-815.
- Billingsley, M. L., J. Yun, B. E. Reese, dkk. (2006). Functional and Structural Properties of Stannin: Roles in Cellular Growth, Selective Toxicity, and Mitochondrial Responses to Injury. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98 (2): 243-250.
- Davidson, Collin E., Brian E. Reese, Melvin L. Billingsley, dkk. (2004). Stannin, A Protein That Localizes to the Mitochondria and Sensitizes NIH-3T3 Cells to Trimethyltin and Dimethyltin Toxicity. *Molecular Pharmacology*, 66 (4): 855-863.
- Geloso, Maria C., A. Vercelli, V. Corvino, dkk. (2002). Cyclooxygenase-2 and Caspase 3 Expression in Trimethyltin-Induced Apoptosis in the Mouse Hippocampus. *Experimental Neurology*, 175 (1): 152-160.
- Patanow, C. M., J. R. Day, dan M. L. Billingsley. (1997). Alterations in Hippocampal Expression of SNAP-25, GAP-43, Stannin and Glial Fibrillary Acidic Protein Following Mechanical and

- Trimethyltin-Induced Injury in the Rat. *Neuroscience*, 76 (1): 187-202.
- Wang, Xinkun dan Elias K. Michaelis. (2010). Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2 (12).
- Fiacco, Todd A., Douglas L Rosene, J. R. Galler, dkk. (2003). Increased Density of hippocampal kainate receptors but Normal Density of NMDA and AMPA Receptors in a Rat Model of Prenatal Protein Malnutrition. *The Journal of Comparative Neurology*, 456 (4): 350-360.
- Korbo, L., O. Ladefoged, H. R. Lam, dkk. (1996). Neuronal Loss in Hippocampus in Rats Exposed to Toluene. *Neurotoxicology*, 17 (2): 359-366.
- Haxaire, Coline, F. R. Turpin, B. Potier, dkk. (2012). Reversal of Age-Related Oxidative Stress Prevents Hippocampal Synaptic Plasticity Deficits by Protecting D-Serine-Dependent NMDA Receptor Activation. *Aging Cell*, 11 (2): 336-344.
- Lu, Yongjun, Runping Wang, Michael Cicha, dkk. (2014). Transient Acidosis Induces a Preconditioning Chloride Conductance that Protects Mouse Nodose Neurons from NMDA-Induced Apoptosis (1132.13). *FASEB Journal*, 28 (S1): 1132.13.
- Quincozes-Santos, Andre, Larissa D. Bobermin, Ana C. Tramontina, dkk. (2014). Oxidative Stress Mediated by NMDA, AMPA/KA Channels in Acute Hippocampal Slices: Neuroprotective Effect of Resveratrol. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 28 (4): 544-551.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, dkk. (1996). Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 87 (2): 171.
- Lattanzi, Wanda, Valentina Corvino, Valentina di Maria, dkk. (2013).

- Gene Expression Profiling as a Tool to Investigate the Molecular Machinery Activated during Hippocampal Neurodegeneration Induced by Trimethyltin (TMT) Administration. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (8): 16817-16835.
- Latini, Laura, Maria C. Geloso, Valentina Corvino, dkk. (2010). Trimethyltin intoxication Up-Regulates Nitric Oxide Synthase in Neurons and Purinergic Ionotropic Receptor 2 in Astrocytes in the Hippocampus. *Journal of Neuroscience Research*, 88 (3): 500-509.
- Koczyk, D. (1996). How Does Trimethyltin Affect the Brain: Facts and Hypotheses. *Acta Neurobiologiae Experimentalis (Wars)*., 56 (2): 587-596.
- Harry, G. J., J. F. Goodrum, M. R. Krigman, dkk. (1985). The Use of Synapsin I as a Biochemical Marker for Neuronal Damage by Trimethyltin. *Brain Research*, 326 (1): 9-18.
- Whittington, D. L., M. L. Woodruff, dan R. H. Baisden. (1989). The Time-Course of Trimethyltin-Induced Fiber and Terminal Degeneration in Hippocampus. *Neurotoxicology and Teratology*, 11 (1): 21-33.

Glosarium

Akumulasi	: Pengumpulan, penimbunan, penghimpunan.
Antimutagen	: Agen yang mengganggu mutagenisitas suatu zat. Gangguan tersebut dapat berupa pencegahan transformasi senyawa promutagenik menjadi mutagen aktif actual, inaktivasi, atau sebaliknya pencegahan reaksi mutagen-DNA.
Antispasmodik	: Golongan obat yang memiliki sifat sebagai relaksan otot polos.
Antitoksin	: Sebuah antibodi dengan fungsi untuk menetralkan racun.
Betakaroten	: Satu jenis karotenoid yang merupakan zat pigmen pada sayur dan buah berwarna merah, kuning, dan oranye. Betakaroten adalah bentuk tidak aktif dari vitamin A yang merupakan antioksidan kuat dan dibutuhkan oleh tubuh.
Demensia	: Penyakit yang menyebabkan penurunan daya ingat dan cara berpikir.
Destruktif	: Bersifat destruksi (merusak, memusnahkan, atau menghancurkan).
Endogen	: Berasal dari dalam; bersumber dari kekuatan di dalam.
Eukariot	: Kelompok makhluk hidup yang memiliki organel yang dilapisi oleh membran.

- Gymnospermae : Merupakan jenis tumbuhan yang berbiji terbuka; memiliki biji terbuka dalam bakal buah.
- Hidrofilik : Sifat kecenderungan yang kuat untuk mengikat atau menyerap air; suka air.
- Inhibitor : Zat yang berfungsi menghambat (menghentikan) reaksi.
- Karsinogenesis : Proses pembentukan kanker, disebut juga dengan onkogenesis atau tumorigenesis.
- Kation : Ion yang bermuatan positif.
- Kloroplas : Bagian dari plastid yang mengandung klorofil.
- Konjugasi : Pembentukan molekul tertentu pada protein.
- Organ : Kumpulan jaringan yang memiliki satu fungsi atau lebih.
- Papilloma : Istilah medis untuk menggambarkan tumor di kulit atau selaput lendir lainnya.
- Rasio : Perbandingan; membandingkan besaran nilai suatu benda walaupun tidak saling berkaitan.
- Reabsorpsi : Mekanisme tubuh untuk menyerap kembali zat yang diperlukan oleh tubuh.
- Selanoprotein : Selenium yang berikatan dengan protein sebagai asam amino dalam bentuk selenometionin dan selenosistein.
- Selenium : Mineral yang ditemukan pada tanah, air, dan beberapa jenis makanan.
- Solven : Zat kimia yang berguna untuk melarutkan, mengencerkan, atau medispersikan zat kimia lain.
- Superoksida dismutase : Salah satu enzim antioksidan intrasel utama yang menangkal radikal bebas.
- Transferase : Unsur yang bekerja mentransfer suatu unsur ke unsur lain.

Tentang Penulis



Prof. Dr. apt. Nurkhasanah, M.Si. – adalah dosen dan Wakil Dekan bidang Al-Islam dan Kemuhammadiyah, Akademik, dan Kemahasiswaan di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (UAD) Yogyakarta. Lahir di Magelang, 9 November 1972. Menyelesaikan studi S1 di Fakultas Farmasi UGM Tahun 1995, S2 Fakultas Farmasi UGM Tahun 2002, dan S3 Biokimia di Universiti Kebangsaan Malaysia Tahun 2009. Pada tahun 2020, penulis dikukuhkan sebagai Guru Besar Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Selain mengajar dan melakukan riset, penulis aktif dalam kegiatan organisasi di dalam maupun di luar kampus. Saat ini, penulis diamanahkan sebagai Wakil Dekan bidang Al-Islam dan Kemuhammadiyah, Akademik, dan Kemahasiswaan Fakultas Farmasi UAD, setelah sebelumnya menjabat sebagai Kaprodi S3 Farmasi UAD. Sementara di luar kampus, penulis tergabung dalam Dewan Pakar Ikatan Cendekiawan Muslim Indonesia (ICMI) serta Lembaga Pemeriksa Halal dan Kajian

Halal Thayyiban PP Muhammadiyah. Penulis juga merupakan salah satu *founder* Halal Centre Universitas Ahmad Dahlan dan *Editor in Chief* Jurnal *Pharmaciana* Universitas Ahmad Dahlan. Puluhan tulisan telah diterbitkan dalam jurnal nasional dan internasional, dan atau dipresentasikan dalam seminar nasional dan internasional. Hingga saat ini, penulis tercatat aktif menjadi trainer, konsultan, pembicara, serta melakukan program pengabdian kepada masyarakat terkait kehalalan dan *herbal medicine*. Penulis dapat dihubungi melalui email: nurkhasanah@pharm.uad.ac.id



Dr. apt. Mochammad Saiful Bachri, S.Si., M.Si.

– adalah dosen di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (UAD) Yogyakarta. Lahir di Kota Rembang, menyelesaikan sekolah SD sampai dengan SMA di Kota Rembang, Jawa Tengah. Kemudian, penulis menyelesaikan studi S1 Farmasi UGM tahun 1995, Profesi Apoteker tahun 1996, studi S2 Ilmu Farmasi UGM Tahun 2004, dan studi S3/doktoral di College of Pharmacy Kyungsoong University South Korea tahun 2010. Selain aktif mengajar, penulis banyak melakukan penelitian farmakologi dan toksikologi terkait stres oksidatif yang berkaitan dengan penyakit gangguan metabolisme seperti diabetes mellitus, rheumatoid arthritis, hepatotoksik, hipertensi, gangguan lambung, nephrotoksik, Alzheimer, serta demencia. Sekarang ini penulis aktif melakukan riset bahan alam (herbal), menjadi narasumber di berbagai seminar, dan rutin menjadi pengisi siaran terapi bahan alam di Radio MQ FM Yogyakarta.








Dr. drh. Sapto Yuliani, MP. – adalah dosen di Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan (UAD) Yogyakarta (2002-sekarang). Lahir di Kebumen, 7 Juli 1971. Menempuh pendidikan mulai dari SD Negeri 1 Kutosari Kebumen, melanjutkan ke SMP Negeri 1 Kebumen, kemudian SMA Negeri 1 Kebumen. Penulis menyelesaikan studi S1 Fakultas Kedokteran Hewan UGM Tahun 1996, studi S2 Sain Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan UGM Tahun 1999, dan studi S3 Ilmu Kedokteran dan Kesehatan, Fakultas Kedokteran, Kesehatan Masyarakat, dan Keperawatan (FK-KMK) UGM Tahun 2016. Selain mengajar, penulis sangat berpengalaman dalam penelitian terkait pengujian praklinik farmakologik. Beberapa penelitiannya yang terpublikasi dan banyak tersitasi antara lain berjudul “The Neuroprotective Effects of an Ethanolic Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extract Against Trimethyltin-Induced Oxidative Stress in Rats” dalam jurnal *Nutritional Neuroscience* (2018); “Turmeric (*Curcuma longa* L.) Extract May Prevent the Deterioration of Spatial Memory and the Deficit of Estimated Total Number of Hippocampal Pyramidal Cells of Trimethyltin-Exposed Rats” dalam jurnal *Drug and Chemical Toxicology* (2018); “Turmeric Extract Inhibits Apoptosis of Hippocampal Neurons of Trimethyltin-Exposed Rats” dalam jurnal *Bratislava Medical Journal* (2017), dan masih banyak lagi. Penulis dapat dihubungi melalui email: sapto.yuliani@pharm.uad.ac.id.

Antioksidan dan Stres Oksidatif

Buku berjudul "Antioksidan dan Stres Oksidatif" ini ditulis untuk memberikan pemahaman tentang antioksidan dan perannya dalam kesehatan. Antioksidan adalah zat yang berperan sangat penting dalam pencegahan berbagai penyakit. Dalam tubuh, terdapat antioksidan endogen yang secara alami dibekalkan oleh Yang Maha Kuasa dalam setiap individu. Selain itu, ada juga antioksidan eksogen yang akan membantu kerja antioksidan endogen dalam menangkal oksidan yang ada dalam tubuh. Antioksidan ini akan menetralkan oksidan-oksidan seperti radikal bebas dan spesies-spesies oksigen reaktif yang berbahaya menjadi molekul yang lebih aman dan netral, seperti oksigen dan air.

Tingginya senyawa-senyawa reaktif dan oksidan dalam tubuh dapat menyebabkan berkembangnya penyakit-penyakit seperti diabetes, demensia, dan penyakit-penyakit degeneratif lainnya. Maka, antioksidan sangat erat kaitannya dengan pencegahan dan penghambatan progresi dari penyakit-penyakit tersebut. Buku ini juga membahas metode-metode pengujian antioksidan baik secara *in vitro* maupun *in vivo* yang sangat berguna bagi para peneliti yang akan mengembangkan penelitian-penelitian tentang antioksidan. Buku ini juga diharapkan menjadi salah satu acuan pengembangan antioksidan dalam bidang kesehatan

UAD
PRESS

 <https://bookstore.uad.ac.id/>
 UAD Press
 @UADPress_
 uadpress@uad.ac.id
 0882 3949 9820

