



**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH ALPUKAT
(*Persea americana* Mill.) DENGAN METODE DNPH
SECARA SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

**NURWALIDAH M.T.
H 511 02 043**



UPI PERPUSTAKAAN UNIV. HASANUDDIN	
Tgl. Terima	11-12-2006
No. Card	Fale MIPA
Temp. Pinjam	1 (satu) ek
Standa	H
No. Inventaris	B52/11-12-6
No. Klas	35280

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH ALPUKAT
(*Persea americana* Mill.) DENGAN METODE DNPH SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS**

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas – tugas dan memenuhi
syarat – syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**NURWALIDAH M.T.
H 511 02 043**

**JURUSAN FARMASI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2006**

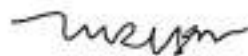
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH ALPUKAT (*Persea
americana* Mill.) DENGAN METODE DNPH SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

NURWALIDAH MT

H 511 02 043


Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. rer.nat Marianti A. Manggau, Apt
NIP 132 010 567

Pembimbing Pertama,



Dra. Christiana Lethe, Apt
NIP 131 122 062

Pembimbing Kedua,



Drs. H. Moh. Hasbi, Apt
NIP 130 369 543

Pada tanggal November 2006

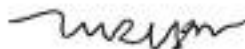
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BUAH ALPUKAT (*Persea
americana* Mill.) DENGAN METODE DNPH SECARA
SPEKTROFOTOMETRI UV-VIS

NURWALIDAH MT

H 511 02 043

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Dr. rer.nat Marianti A. Manggau, Apt
NIP 132 010 567

Pembimbing Pertama,



Dra. Christiana Lethe, Apt
NIP 131 122 062

Pembimbing Kedua,



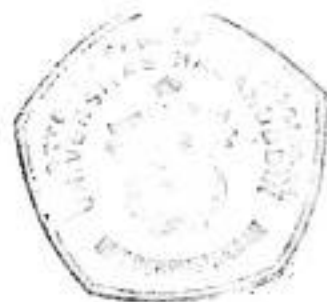
Drs. H. Moh. Hasbi, Apt
NIP 130 369 543

Pada tanggal November 2006

ABSTRAK

Telah dilakukan uji aktivitas antioksidan buah alpukat (*Persea americana* Mill.). Aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH). Uji dilakukan dengan mereaksikan sari etanol alpukat dengan *Bovine serum albumin* (BSA) 30% dengan radikal bebas hidroksil yang dihasilkan dari pereaksi Fenton yakni reaksi antara Fe^{2+} dengan hidrogen peroksida. Adanya kerusakan protein akibat reaksinya dengan radikal bebas hidroksil akan membentuk senyawa dikarbonil yang selanjutnya akan bereaksi dengan senyawa DNPH membentuk senyawa dinitrofenilhidrazon. Senyawa dinitrofenilhidrazon tersebut diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 390 nm. Sifat antioksidan ditandai dengan menurunnya absorbansi larutan uji dibandingkan dengan larutan kontrol. Dari hasil penelitian diperoleh aktivitas antioksidan sari etanol 25% dan 50% masing-masing 207,203% dan 232,041%.

Kata kunci : alpukat, 2,4 Dinitrofenilhidrazin, pereaksi Fenton, senyawa dikarbonil



ABSTRACT

The research about antioxidant activity of avocado (*Persea americana* Mill.) have been done. Antioxidant activity was determined by 2,4 Dinitrophenylhydrazine (DNPH) method. The test was conducted by reacting extract of ethanol avocado with Bovine serum albumin (BSA) 30% and radical hydroxyl from Fenton's reagent result from reaction between Fe^{2+} with hidrogen peroxide. Existence of damage of protein caused radical hydroxyl will form the compound dicarbonil later on will react with the compound DNPH form the compound dinitrophenylhidrazon. The compound Dinitrofenilhidrazon measured its absorbance with the spectrophotometer at wavelength 390 nm. Antioxidant activity was detected by decreasing condensation absorbance compared by a absorbance control. From research result obtained value of antioxidant activity of extract etanol 25% and 50% each 207,203% and 232,041%.

Key word : Avocado, 2,4 Dinitrophenylhydrazine, Fenton's reagent, dicarbonil compound

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah Subhanahu Wataala yang telah memberikan rahmat dan hidayahNya sehingga tugas akhir ini dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana pada Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin. Salawat serta salam diucapkan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad Sallalallahu Alaihi Wasallam

Untuk itu dengan segala ketulusan, keikhlasan hati dan kerendahan hati disampaikan ucapan terima kasih serta hormat yang sebesar-besarnya dan setulus-tulusnya kepada Ibu Dr. rer-nat Marianti A. Manggau, Apt sebagai Pembimbing Utama dan Ibu Dra. Christiana Lethe, Apt sebagai Pembimbing Pertama serta Bapak Drs H. Moh. Hasbi, Apt sebagai Pembimbing Kedua yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan kesabaran selama ini untuk memberi petunjuk, membagi ilmu dan menyumbangkan pikiran serta saran dalam membimbing selama melakukan penelitian sehingga selesainya skripsi ini.

Pada kesempatan ini pula, disampaikan terima kasih kepada :

1. Bapak Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
2. Ibu Ketua Jurusan serta Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin
3. Ibu Dra Nursiah Hasyim, CES, selaku Penasehat Akademik penulis

Semua rekan-rekan Angkatan 2002 yang tidak dapat disebutkan namanya satu per satu atas kebersamaannya selama ini. Sahabatku Ratnawati Alwi, Miftahul Jannah, Asriani Suhaenah, Yulianti, Irwati serta teman-teman belajarku Rina Agustina, Fitria, guruku Hafsa Salim serta semua teman-teman di Fatimah 1. Rasa sayang dan terima kasih untuk Kakakku tercinta Nur Asia, temanku nun jauh disana Yetty Sarah, yang tak terlupakan jasanya Kanda Ramlah dan semua teman-teman di Nirwana I.

Rasa hormat, sayang dan cinta yang terdalam dihaturkan kepada orang yang paling kucinta dan kuhormati di dunia dan akhirat, Ayahanda Muhammad Tahir dan Ibunda Jahora A. Rauf yang telah melimpahkan segenap cinta, kasih sayang dan perhatian yang teramat tulus dan dalam yang selalu mendoakan, membiayai, bersabar dan memberikan dorongan dalam menempuh jenjang pendidikan. Rasa cinta dan kasih untuk Kakandaku tersayang Nurhasanah, adinda Rabithal Alam dan Suryadin serta seluruh keluarga dan handai taulan yang tidak dapat disebutkan namanya satu demi satu.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah memberikan bantuan baik tenaga maupun pikiran, semoga Allah Subhanahu Wataala senantiasa memberi rahmat dan RidhoNya. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi keilmuan farmasi pada khususnya dan masyarakat luas pada umumnya.

Makassar, September 2006

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACK.....	v
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	3
II.1 Uraian tanaman Alpukat (<i>Persea americana</i> Mill.).....	3
II.1.1 Klasifikasi Tanaman.....	3
II.1.2 Nama Daerah.....	3
II.1.3 Nama Asing.....	3
II.1.3 Morfologi Tanaman.....	4
II.1.4 Tempat Tumbuh.....	4
II.1.5 Kandungan Kimia.....	5

II.1.6 Kegunaan.....	5
II.2 Radikal Bebas.....	6
II.3 Antioksidan.....	10
II.3.1 Mekanisme kerja antioksidan.....	11
II.3.2 Jenis-jenis antioksidan.....	12
II.3.2.1 Antioksidan primer.....	12
II.3.2.2 Antioksidan sekunder.....	13
II.3.3 Jenis-jenis vitamin.....	13
II.3.3.1 Vitamin yang larut dalam lemak.....	14
II.3.3.1.1 Vitamin A.....	14
II.3.3.1.2 Vitamin E.....	16
II.3.3.2 Vitamin yang larut air.....	18
II.4 Senyawa Dikarbonil.....	18
II.5. Metode Spektrofotometri Ultraviolet-Visible.....	18
II.5.1 Prinsip Dasar.....	19
II.5.2 Serapan Oleh Senyawa.....	21
II.5.3 Peralatan Spektrofotometer.....	22
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN.....	24
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan.....	24
III.2 Penyiapan Bahan Penelitian.....	24
III.2.1 Pengambilan Sampel.....	24
III.2.2 Penyiapan Sampel.....	24

III.4 Penyiapan Pereaksi.....	25
III.4.1 Pereaksi 2,4 Dinitrophenylhidrazin (DNPH).....	25
III.4.2 Pereaksi Fe-EDTA.....	25
III.4.3 TCA 10% dan 20%.....	25
III.5 Prosedur Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode 2,4 dinitrophenilhidrazin.....	25
III.6 Pengumpulan dan Analisis Data.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	27
IV.1 Hasil Penelitian.....	27
IV.2 Pembahasan.....	27
BAB V PENUTUP.....	32
V.1 Kesimpulan.....	32
V.2 Saran.....	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data absorban larutan kontrol.....	36
2. Data absorban larutan sampel	36
3. Data potensi antioksidan buah alpukat.....	36

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Gambar beta-karoten.....	15
2. Gambar α -tokoferol.....	17
3. Gambar vitamin C.....	18
4. Skema spektrofotometer.....	23
5. Gambar buah alpukat.....	37
6. Gambar pohon alpukat.....	38
7. Kurva serapan larutan kontrol negatif.....	38
8. Kurva serapan larutan kontrol positif beta karoten 0,05%.....	39
9. Kurva serapan larutan sampel 25%.....	40
10. Kurva serapan larutan sampel 50%.....	41

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema kerja larutan kontrol negatif.....	42
2. Skema kerja larutan kontrol positif dan larutan sampel.....	43
3. Contoh perhitungan aktivitas antioksidan.....	44

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti
A	Absorban
AU	Serapan baku
BSA	Bovine Serum Albumin
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazin
K	Kontrol
nm	Nano meter (satuan panjang gelombang)
λ	Panjang gelombang

BAB I PENDAHULUAN

Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan atau gangguan fungsi sel-sel tubuh. Bila sel-sel terganggu, bisa menimbulkan penyakit degeneratif seperti aterosklerosis, penyakit jantung, hipertensi, stroke dan diabetes mellitus. Sering memakan alpukat, bisa mengendalikan penyakit-penyakit tersebut. Kemampuan antioksidan disebabkan oleh kandungan betakaroten, vitamin C, vitamin E, flavanoid dan glutathion dalam alpukat. (1).

Seringkali antioksidan sangat efektif karena dengan mudah dioksidasi daripada atom atau molekul yang dilindungi. Dibawah kondisi tertentu, yang disebut sebagai stress oksidatif, beberapa kerusakan bisa terjadi. Kerusakan adalah hasil utama dari inaktivasi enzim, kerusakan DNA dan destruksi membran. Agar antioksidan dapat menghancurkan semua jenis radikal bebas secara efektif, maka antioksidan tersebut harus berada dalam keadaan tereduksi.. Asam askorbat berada dalam keadaan tereduksi sehingga dapat secara efektif menetralkan radikal bebas tertentu dan membantu menyimpan vitamin E, suatu antioksidan penting lainnya, juga dalam keadaan tereduksi. (2,3)

Antioksidansia lainnya yang penting antara lain vitamin A, C, dan E serta enzim-enzim alamiah glutathion peroxydase (GPx), superoxide-dismutase (SOD) dan katalase. Sedangkan antioksidansia yang banyak digunakan sebagai *food suplement* adalah vitamin A, C, dan E, quercetin,

mineral selenium (Se), dan Seng (Zn). (4) Sedangkan tanaman yang berkhasiat antioksidan antara lain pepaya, bayam dan berbagai jenis sayur-sayuran, jeruk, nanas, apel, pir, dan jenis buah lainnya. (3)

Alpukat adalah salah satu buah yang mempunyai banyak manfaat bagi kesehatan, terutama akibat radikal bebas antara lain melindungi paru-paru dan saluran pernapasan serta kerusakan kulit dari radikal bebas, mencegah oksidasi kolesterol, dan menjaga keseimbangan hormon tubuh. (3)

Aktivitas antioksidan diukur menggunakan metode 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH) berdasarkan kerusakan protein. *Bovine serum albumin* (BSA) akan bereaksi dengan radikal hidroksil dari pereaksi fenton membentuk senyawa dikarbonil yang selanjutnya direaksikan dengan DNPH membentuk senyawa dinitrofenilhidrazon. Senyawa dinitrofenilhidrazon ini kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 390 nm. Adanya aktivitas antioksidan ditandai dengan penurunan absorbansi larutan uji dibandingkan dengan kontrol negatif. (5)

Hipotesa penelitian ini adalah buah alpukat berefek antioksidan karena mengandung vitamin A, C, E, beta karoten, serta flavanoid. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan buah alpukat (*Persea americana* Mill.) suku lauraceae dengan metode 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH) dengan penghambatan terhadap pembentukan senyawa dikarbonil.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman Alpukat

II.1.1 Klasifikasi tanaman

Divisi	: Plantae
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak Kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Lauraceae
Marga	: Persea
Jenis	: <i>Persea americana</i> Mill.
Sinonim	: <i>Persea gratissima</i> Gaerth. (6)

II.1.2 Nama Daerah

Jawa	: Apuket, alpuket, apokat, avokat, plokot
Sunda	: Jambu wolanda
Makassar	: Alpokat, apokat.
Bima	: Apoka
Lombok	: Apukat. (7)

II.1.3 Nama Asing

Inggris	: Advocaat, avocatier, alligatur pear, avocado pear
Prancis	: Puires d' avokat (7)

II.1.3 Morfologi Tanaman

Pohon alpukat tumbuh membentuk tajuk yang berbentuk kubah dan merupakan pohon yang selamanya hijau, yang tingginya dapat sekitar 18 meter. Bunga alpukat kecil, berwarna hijau muda, dan mengelompok dalam panikel majemuk tandan. Buah alpukat berbiji tunggal besar. Biji dikelilingi daging buah yang tebal dan kulit buah biasanya tebal, bervariasi menurut varietas. Bentuk dan ukuran berbeda, tetapi buah alpukat pada umumnya bentuknya seperti pear atau bulat. Warna buah alpukat juga bergantung pada varietasnya, sehingga terdapat buah alpukat yang berwarna hijau-kuning, kepekatan hijau, ungu, coklat, sampai hampir hitam pekat. Daunnya memiliki bentuk yang bervariasi yaitu elips, oval, lanset dengan panjang 7,5-40 cm. (8)

II.1.4 Tempat Tumbuh

Tanaman Alpukat tumbuh pada daerah subtropikal dan pada iklim mediteranian. Alpukat harus terlindung dari angin karena angin dapat mematahkan dahan yang memiliki buah. Pohon buah dari Amerika Tengah, tumbuh liar di hutan-hutan, juga banyak ditanam di kebun dan pekarangan yang lapisan tanahnya gembur dan subur serta tidak tergenang air. Walau dapat berbuah di dataran rendah, tapi hasilnya akan memuaskan bila ditanam pada ketinggian 200-1000 m diatas permukaan laut (dpl), pada daerah tropik dan subtropik yang banyak curah hujannya. (7)

II.1.5 Kandungan Kimia

Alpukat kaya dengan kandungan kimia, antara lain saponin, alkaloida, flavonoida, quersetin tanin, polifenol. (9) Alpukat mengandung vitamin A dan karoten yang baik. Dalam 100 gram buah alpukat terkandung sekitar 300 - 400 IU vitamin A, dan sekitar 165 mikrogram karoten. Terkandung pula tiamin, riboflavin, dan niasin, yang tergolong vitamin B-kompleks. Kadar vitamin C alpukat cukup baik, sekitar 14 mg per 100 gram buah alpukat. Buah alpukat mengandung kadar glutathione tertinggi di antara buah-buahan, yaitu 21 mg per 100 gram buah segar. Tanaman ini mengandung alkaloid, flavonoid, protein, lemak, kalsium, fosfor, zat besi, belerang, vitamin A, B, C dan D, juga betakaroten dan asam lemak tak jenuh ganda. Buah alpukat juga kaya akan mineral kalium (604 mg/100 g) dan rendah mineral natrium (4 mg/ 100 g) dan kandungan Serat alpukat juga tinggi sekitar 1,6 gram/100 g (10)

II.1.6 Kegunaan

Buah yang kaya lemak tak jenuh ini ternyata memiliki khasiat obat yang sangat bermanfaat mengatasi darah tinggi. (9). Buah alpukat kaya akan mineral kalium (604 mg/100 g) dan rendah mineral natrium (4 mg/ 100 g). Dilaporkan makanan yang kadar kaliumnya tinggi dan natriumnya rendah dengan rasio K : Na lebih besar dari 5:1 adalah makanan yang sehat untuk menjaga kesehatan jantung dan pembuluh darah. Serat alpukat yang tinggi sekitar 1,6 gram/100 g sangat bermanfaat untuk membantu sistem pencernaan dan membuang sisa-sisa

pencernaan yang beracun. Glutation dilaporkan berfungsi sebagai zat antikanker yang dapat menonaktifkan sedikitnya 30 zat penyebab kanker. Kadar glutathion yang tinggi membantu menghambat kerusakan tubuh akibat senyawa beracun, misalnya bahan pencemar lingkungan seperti pestisida, logam-logam berat (timah), yaitu dengan cara menawarkan racun tersebut lalu membuangnya lewat sistem pembuangan (feses, urin, atau keringat). Alpukat dapat menurunkan kadar gula darah yang tinggi. Daunnya mengandung minyak yang dapat digunakan dalam industri kosmetik, dan sebagai bahan insektisida. mampu menurunkan kadar trigliserid dan kolesterol darah yang tinggi.(10)

II.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, sedangkan spesies oksigen reaktif adalah spesies oksigen yang potensial toksik. (11,12). Konsekuensi berupa kecenderungan memperoleh elektron dari substansi lain menjadikan radikal bebas bersifat sangat reaktif. Tidak semua spesies oksigen reaktif adalah radikal bebas misalnya H_2O_2 dan *singlet oksigen* bukan radikal bebas, tetapi termasuk spesies oksigen reaktif. Karena adanya kecenderungan mengambil sebuah elektron (e^-) dan senyawa-senyawa lain maka spesies oksigen ini sangat reaktif. (12)

Reduksi terhadap oksigen menjadi molekul air adalah reaksi fundamental dalam pernapasan, yakni makanan diubah menjadi energi yang berguna untuk keperluan sel-sel dalam tubuh kita. Penambahan

berturut-turut sebanyak empat elektron pada oksigen akan menghasilkan air dan juga menghasilkan radikal bebas yang mempunyai potensi merusak sel. (13). Molekul tersebut adalah radikal bebas superoksida, hidrogen peroksida, dan radikal bebas hidroksil. Unsur yang terakhir ini bersifat sangat toksik tetapi memiliki masa hidup singkat. Radikal hidroksil bekerja melalui reaksi Fenton dan Haber Weiss yang dikatalisis Fe^{2+} . (11) Zat gizi yang paling sensitif terhadap kerusakan oleh radikal bebas adalah asam lemak majemuk tak jenuh yang dikenal dengan lipid peroksidasi. Di luar tubuh, asam lemak dalam makanan yang bereaksi dengan radikal bebas menghasilkan peroksidasi yang disebut tengik. (13)

Reaksi radikal bebas sebenarnya adalah suatu mekanisme biokimia yang normal yang terjadi dalam tubuh kita. Radikal bebas biasanya hanya bersifat intermediet (perantara), dan kemudian cepat diubah menjadi substansi lain yang tidak membahayakan tubuh kita. Tetapi jika pada kesempatan yang berumur sangat pendek ini, radikal bebas bertemu DNA atau enzim atau asam lemak majemuk tak jenuh (*polyunsaturated fats*), maka suatu permulaan sel dapat terjadi. Karena lemak tak jenuh merupakan target utama radikal bebas, maka lemak pada membran sel khususnya yang tak jenuh merupakan sasaran radikal bebas. Jika reaksi berantai tersebut terjadi di dalam membran sel, maka membran dapat rusak atau hancur, sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Sedangkan keterlibatan radikal bebas pada karsinogenesis karena kemampuannya merusak gen sehingga kontrol pembelahan sel menjadi tidak terkendali. (13)

Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain : (14)

1). Membran sel

Terutama komponen penyusun membran berupa asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid dan mungkin juga protein. Perusakan bagian dalam pembuluh darah akan mempermudah pengendapan berbagai zat pada bagian yang rusak tersebut, termasuk kolesterol, sehingga timbul aterosklerosis. Serangan radikal hidroksil pada asam lemak tak jenuh dimulai dengan interaksi oksigen pada rangkaian sehingga terbentuk lipid hidroperoksida, yang selanjutnya merusak bagian sel dimana hidroperoksida ini berada.

2) Kerusakan protein

Terjadinya kerusakan protein termasuk oksidasi protein akan mengakibatkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada, sebagai contoh kerusakan protein pada lensa mata mengakibatkan terjadinya katarak.

3) Kerusakan DNA

Radikal bebas hanya salah satu faktor dari banyak faktor yang menyebabkan kerusakan DNA. Penyebab lain misalnya virus, radiasi dan zat kimia karsinogen. Sebagai akibat kerusakan DNA ini dapat timbul penyakit kanker.

4) Peroksida lipid

Lipid dianggap molekul yang paling sensitif terhadap serangan radikal bebas sehingga terbentuk lipid peroksida. Terbentuknya lipid

peroksida yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan lain dianggap salah satu penyebab terjadinya berbagai penyakit degeneratif.

5) Dapat menimbulkan autoimun

Autoimun adalah terbentuknya antibodi terhadap suatu sel tubuh biasa. Pada keadaan normal antibodi hanya terbentuk bila ada antigen yang masuk dalam tubuh. Adanya antibodi untuk sel tubuh biasa dapat merusak jaringan tubuh dan sangat berbahaya.

6) Proses ketuaan

Secara teori radikal bebas dapat dipunahkan oleh berbagai antioksidan, tetapi tidak pernah mencapai 100%. Karena itu secara pelan dan pasti terjadi kerusakan jaringan oleh radikal bebas yang tidak terpunahkan. Kerusakan jaringan secara pelan ini menyebabkan terjadinya ketuaan.

Jika radikal bebas sekali terbentuk, maka reaksi berantai dapat menghasilkan banyak molekul sejenis. Molekul ini sangat reaktif dan mampu menyebabkan kerusakan sel. Radikal bebas antara lain hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, asam hipoklorat, oksigen singlet, dan peroksil. Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species/ROS) lainnya yang diproduksi dalam jumlah normal sesungguhnya penting untuk menjaga fungsi biologis, seperti halnya sel darah putih menghasilkan hidropersida untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan fungi. Namun, jika jumlahnya berlebihan, ia akan mencari pasangan elektronnya dengan merampas secara radikal dari molekul lain

yang mengakibatkan kerusakan oksidatif jaringan yang sering dikenal sebagai stres oksidatif (15).

Radikal bebas mengakibatkan kerusakan sel yang pada ujungnya menimbulkan berbagai penyakit, seperti penuaan dini, penyakit jantung, artritis, kanker, katarak dsb. Radikal bebas adalah molekul yang tidak memiliki pasangan elektron, dan karena dalam keadaan normal elektron hadir secara berpasangan, radikal bebas memiliki tendensi untuk mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas ini mengambil elektron yang telah berpasangan, sehingga merobek membran sel dan merusak materi genetik, proses ini dikenal dengan nama oksidasi. Sebagian radikal bebas terbentuk sebagai hasil dari proses metabolisme alami tubuh. Tapi sebagian lainnya terbentuk karena pengaruh faktor-faktor luar seperti polutan lingkungan, kurang olahraga, dan pola makan yang tidak sehat. (15)

II.3 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang stabil. Antioksidan merupakan semua bahan yang dapat menunda atau mencegah kerusakan akibat oksidasi pada molekul sasaran (16). Dalam pengertian kimia, antioksidan adalah senyawa-senyawa pemberi elektron, tetapi dalam pengertian biologis lebih luas lagi, yaitu semua senyawa yang dapat meredakan dampak negatif oksidan, termasuk enzim-enzim dan protein-protein pengikat logam. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat

menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler, dan penuaan (17).

II.3.1 Mekanisme kerja antioksidan

Antioksidan bekerja melindungi sel dan jaringan sasaran dengan cara (18):

1. memusnahkan (*scavenge*) radikal bebas secara enzimatik atau dengan reaksi kimia langsung
2. mengurangi pembentukan radikal bebas
3. mengikat ion logam yang terlibat dalam pembentukan spesies yang reaktif (transferin, seruloplasmin, albumin)
4. memperbaiki kerusakan sasaran
5. menghancurkan molekul yang rusak dan menggantinya dengan yang baru.

Antioksidan ada dua macam, yaitu antioksidan endogen (enzim) dan antioksidan eksogen (vitamin) (19,18,20). Antioksidan endogen adalah antioksidan yang ada dalam tubuh organisme misalnya enzim katalase, glutathion peroksidase (GPx), superoksid dismutase (SOD), asam urat, dan ubiquinol (19,21,18). Antioksidan eksogen adalah antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh organisme seperti tokoferol, flavonoid, karotenoid dan vitamin C (19,21,20). Antioksidan vitamin lebih populer sebagai antioksidan dibandingkan antioksidan enzim, mencakup α -tokoferol (vitamin E), β -karoten (vitamin A), asam askorbat

(vitamin C) (22). Vitamin C bekerja secara sinergis dengan beberapa vitamin dan mineral lain, dan juga antioksidan lain, untuk menurunkan tingkat kanker dan kerusakan kardiovaskuler dan untuk meningkatkan efek proteksi dari sistem pertahanan tubuh. (3)

Pemusnahan radikal bebas hanya dapat dilakukan bila tepat waktu, tepat tempat dan tepat dosis. Bila antioksidan diperlukan pada membran dari mikrosom sedangkan keberadaanya di sitosol maka antioksidan tersebut tidak tepat tempat. Dalam kehidupan sehari-hari yang dapat dilakukan untuk memusnahkan radikal bebas yang terbentuk ialah mengkonsumsi zat gizi yang berperan sebagai antioksidan secukupnya setiap hari. (13)

Antioksidan sintetik seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksi Toluen), PG (propil galat), dan TBHQ (tetra-butil hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz) sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan (23).

Antioksidan terdapat secara alamiah dalam lemak nabati. Ada dua macam antioksidan berdasarkan cara kerjanya yaitu antioksidan primer dan antioksidan sekunder.

II.3.2 Jenis-jenis antioksidan

II.3.2.1 Antioksidan primer

Antioksidan primer adalah suatu zat yang dapat menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal yang melepaskan hidrogen. Zat-zat yang termasuk dalam golongan ini adalah yang berasal dari alam dan dapat pula buatan, antara lain ; tokoferol, lesitin, fosfatida, sesamol,

gospol dan asam askorbat. Antioksidan alam yang paling banyak ditemukan dalam minyak nabati adalah tokoferol yang mempunyai keaktifan vitamin E dan terdapat dalam bentuk α , β , γ , dan δ tokoferol tapi α -tokoferol yang menunjukkan keaktifan vitamin E yang paling tinggi. Antioksidan sintetik yang banyak digunakan sekarang adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya agak beracun. Karena itu, penambahan antioksidan ini harus memenuhi beberapa syarat, misalnya tidak berbahaya bagi kesehatan, tidak menimbulkan warna yang tidak diinginkan, efektif pada konsentrasi rendah, larut dalam lemak, mudah didapat, dan ekonomis. Empat macam antioksidan yang sering digunakan pada bahan makanan adalah *Butylated hydroxyanisole* (BHA), *Butylated hydroxytoluene* (BHT), *Propylgallate* (PG), dan *Nordihydroquairitic acid* (NDGA). (16)

II.3.2.2 Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder adalah suatu zat yang dapat mencegah kerja peroksidan sehingga dapat digolongkan sebagai sinergik. Beberapa asam organik tertentu, biasanya asam di- atau trikarboksilat, dapat mengikat logam-logam (sequistran). Misalnya satu molekul asam sitrat akan mengikat prooksidan Fe seperti sering dilakukan pada minyak kacang kedelai. EDTA (Etilendiamin tetraasetat) adalah logam yang sering digunakan dalam minyak salad (16).

II.3.3 Jenis-jenis vitamin

Antioksidan yang paling umum ditemui adalah dalam bentuk vitamin. Berdasarkan kelarutannya, vitamin dibagi 2 yaitu;

II.3.3.1 Vitamin yang larut dalam lemak

Vitamin yang larut dalam lipid (larut lipid) adalah molekul hidrofobik apolar. Molekul ini tidak dapat disintesis oleh tubuh dalam jumlah yang memadai sehingga harus diperoleh dari makanan. Vitamin larut lipid dapat diserap secara efisien jika terdapat penyerapan lemak yang normal. Begitu diserap, molekul vitamin tersebut harus diangkut dalam darah seperti halnya lipid apolar lainnya, yaitu lipoprotein. (11)

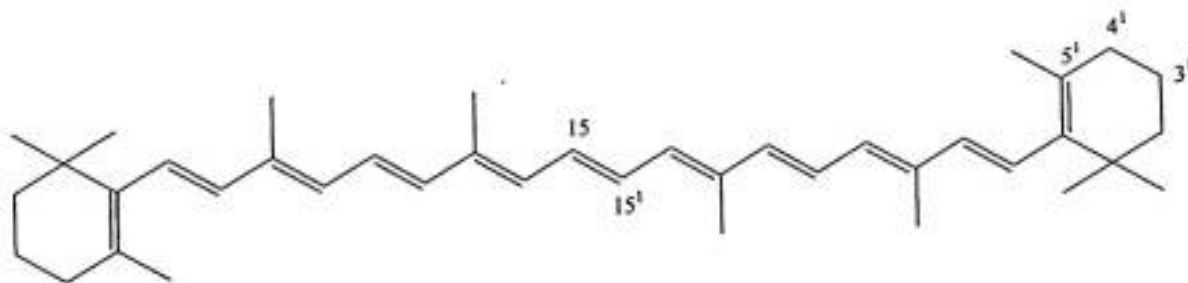
II. 3.3.1.1 Vitamin A

Vitamin A penting bagi penglihatan, imunitas, dan kulit serta rambut yang sehat juga sebagai pencegah kanker. Vitamin A dapat diperoleh dalam bentuk pro-vitamin A. Pro-vitamin A dibentuk dalam tubuh kita dari perubahan karotenoid yang dikenal sebagai senyawa awal. Beta karoten merupakan karotenoid utama yang diubah menjadi vitamin. (3)

Karotenoid tertentu yang mempunyai struktur kimia khusus mampu menetralkan atau meadamkan reaktivitas *singlet oksigen* dengan cara menghamburkan energi ke seluruh molekul karotenoid. Supaya dapat memadamkan *singlet oksigen* tersebut, karotenoid harus mempunyai sedikitnya 9 ikatan rangkap dengan ikatan tunggal diantara ikatan rangkap. Susunan ikatan kimia ini disebut ikatan rangkap terkonjugasi. Beta-karoten mempunyai 11 ikatan kimia tersebut. Energi dari *singlet oksigen* dipindahkan ke beta-karoten dan dihamburkan ke semua ikatan

tunggal dan rangkap, kemudian dilepas sebagai panas dan molekul beta karoten kembali ke energi semula. Pada saat itu *singlet oksigen* telah diubah menjadi oksigen normal. Beta-karoten tidak rusak oleh oleh pemindahan energi dari *singlet oksigen* dan dapat mengulangi proses yang sama dengan *singlet oksigen* lain. Satu mol beta-karoten mampu memadamkan sampai 1000 mol *singlet oksigen*.(13)

Gambar 1. Beta karoten



β -KAROTEN

Beta karoten merupakan antioksidan dan mempunyai peran dalam menangkap radikal bebas peroksil di dalam jaringan pada tekanan parsial oksigen yang rendah. Karena bersifat efektif pada konsentrasi oksigen yang rendah, beta-karoten melengkapi sifat antioksidan vitamin E yang efektif pada konsentrasi yang lebih tinggi. Sifat antioksidan kedua vitamin larut-lipid ini menjelaskan antikanker yang mungkin dimilikinya. sKonsentrasi beta-karoten dan α - tokoferol yang rendah di dalam serum berkaitan dengan pembentukan katarak senilis. (11)

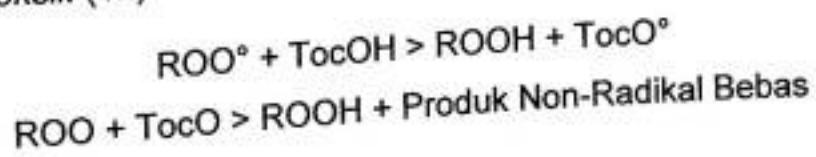
Beta karoten saat ini dikenal sebagai prekursor retinol (vitamin A). Selain itu senyawa ini merupakan antioksidan yang baik dan penangkap radikal bebas terutama peroksil dan radikal hidroksil. Sebagai

antioksidan, beta-karoten terutama mampu melindungi membran DNA dan komponen sel lainnya dari kerusakan oksidatif. (27)

Tanaman hijau dalam proses fotosintesis menghasilkan *singlet oksigen*. Karotenoid tertentu disintesis tanaman dari perusakan *singlet oksigen* yang sangat reaktif dan salah satunya yaitu beta-karoten yang disintesis untuk melindungi fotooksidasi. (27)

II.3.3.1.2 Vitamin E

Vitamin E merupakan mikronutrisi penting yang larut dalam lemak, yang berfungsi sebagai antioksidan yang melindungi membran lipid di dalam tubuh dari oksidasi dan bekerja secara sinergis dengan vitamin dan mineral lain seperti vitamin C dan selenium dan flavanoid. Vitamin E melindungi penyimpanan vitamin A dalam tubuh, mencegah kerusakan sel darah merah, menguatkan dinding-dinding kapiler, begitu juga aliran darah ke jantung dan otak, menurunkan kolesterol dan trigliserida pada darah dan membantu regulasi metabolisme protein dan kalsium. (3). Senyawa ini dapat mengatasi *singlet Oksigen*, *superoksida* dan radikal bebas *peroksil*. (12)



Keterangan : Reaksi di atas menunjukkan aktivitas Tokoferol (TocOH) terhadap Radikal Peroksil.

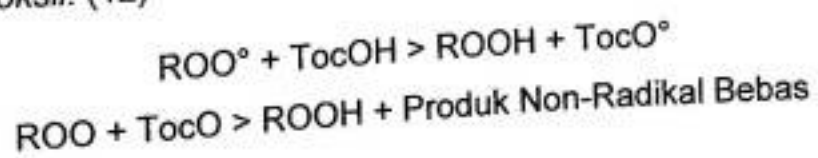
D- α - tokoferol mempunyai distribusi alami yang paling luas dan aktivitas biologik terbesar. Gangguan absorpsi lemak akan menimbulkan defisiensi vitamin E karena tokoferol ternyata larut di dalam lemak

antioksidan, beta-karoten terutama mampu melindungi membran DNA dan komponen sel lainnya dari kerusakan oksidatif. (27)

Tanaman hijau dalam proses fotosintesis menghasilkan *singlet oksigen*. Karotenoid tertentu disintesis tanaman dari perusakan *singlet oksigen* yang sangat reaktif dan salah satunya yaitu beta-karoten yang disintesis untuk melindungi fotooksidasi. (27)

II.3.3.1.2 Vitamin E

Vitamin E merupakan mikronutrisi penting yang larut dalam lemak, yang berfungsi sebagai antioksidan yang melindungi membran lipid di dalam tubuh dari oksidasi dan bekerja secara sinergis dengan vitamin dan mineral lain seperti vitamin C dan selenium dan flavanoid. Vitamin E melindungi penyimpanan vitamin A dalam tubuh, mencegah kerusakan sel darah merah, menguatkan dinding-dinding kapiler, begitu juga aliran darah ke jantung dan otak, menurunkan kolesterol dan trigliserida pada darah dan membantu regulasi metabolisme protein dan kalsium. (3). Senyawa ini dapat mengatasi *singlet Oksigen*, *superoksida* dan radikal bebas *peroksil*. (12)



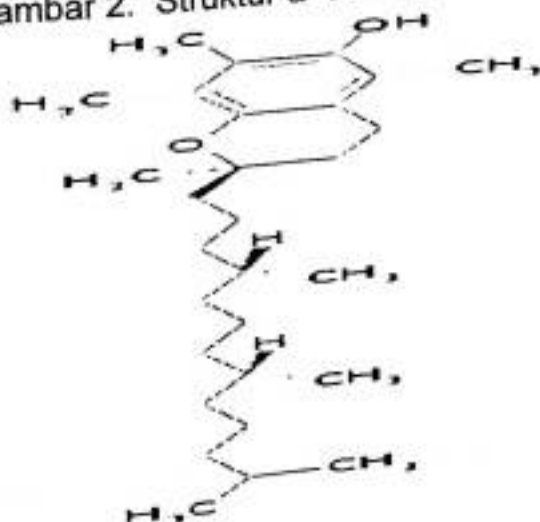
Keterangan : Reaksi di atas menunjukkan aktivitas Tokoferol (TocOH) terhadap Radikal Peroksil.

D- α - tokoferol mempunyai distribusi alami yang paling luas dan aktivitas biologik terbesar. Gangguan absorpsi lemak akan menimbulkan defisiensi vitamin E karena tokoferol ternyata larut di dalam lemak

makanan dan dibebaskan serta diserap pada saat lemak dicerna. Vitamin E merupakan pertahanan baris pertama terhadap proses peroksidasi asam lemak jenuh tak ganda yang terdapat di dalam fosfolipid membran seluler. Fosfolipid mitokondria, retikulum endoplasma, serta membran plasma memiliki afinitas terhadap α - tokoferol, dan vitamin E terkonsentrasi di tempat-tempat ini. α - tokoferol berfungsi sebagai antioksidan memutus berbagai rantai radikal bebas. (11)

Glutation peroksidase, yang memiliki selenium sebagai komponen integral di dalamnya, membentuk pertahanan baris kedua terhadap peroksida sebelum senyawa tersebut dapat merusak membran dan komponen sel lainnya. Dengan demikian, tokoferol dan selenium saling menguatkan kerja dalam melawan peroksida lipid. Disamping itu, selenium diperlukan untuk mempertahankan fungsi pankreas yang normal yang diperlukan bagi proses pencernaan serta penyerapan lipid, termasuk vitamin E. Sebaliknya, vitamin E mengurangi kebutuhan akan selenium dengan mencegah hilangnya selenium dari dalam tubuh atau dengan mempertahankannya dalam bentuk aktif. (11)

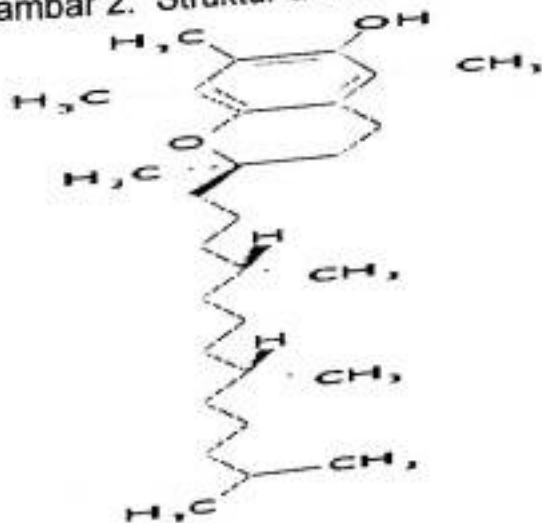
Gambar 2. Struktur α - tokoferol



makanan dan dibebaskan serta diserap pada saat lemak dicerna. Vitamin E merupakan pertahanan baris pertama terhadap proses peroksidasi asam lemak jenuh tak ganda yang terdapat di dalam fosfolipid membran seluler. Fosfolipid mitokondria, retikulum endoplasma, serta membran plasma memiliki afinitas terhadap α - tokoferol, dan vitamin E terkonsentrasi di tempat-tempat ini. α - tokoferol berfungsi sebagai antioksidan memutus berbagai rantai radikal bebas. (11)

Glutation peroksidase, yang memiliki selenium sebagai komponen integral di dalamnya, membentuk pertahanan baris kedua terhadap peroksida sebelum senyawa tersebut dapat merusak membran dan komponen sel lainnya. Dengan demikian, tokoferol dan selenium saling menguatkan kerja dalam melawan peroksida lipid. Disamping itu, selenium diperlukan untuk mempertahankan fungsi pankreas yang normal yang diperlukan bagi proses pencernaan serta penyerapan lipid, termasuk vitamin E. Sebaliknya, vitamin E mengurangi kebutuhan akan selenium dengan mencegah hilangnya selenium dari dalam tubuh atau dengan mempertahankannya dalam bentuk aktif. (11)

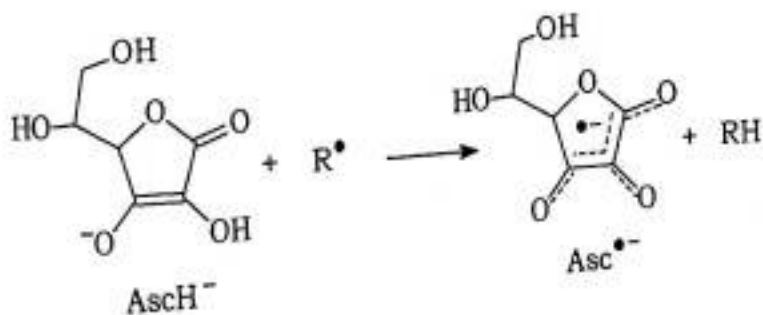
Gambar 2. Struktur α - tokoferol



II.3.3.2 Vitamin yang larut air

Vitamin C merupakan antioksidan yang sangat tinggi dengan mencegah mencegah pembentukan agen penyebab kanker dan mengurangi toksisitas karena radiasi, mutasi dan kanker. (3). Vitamin larut air ini merupakan molekul pelindung terhadap berbagai ROS (Reactive Species Oxygen) di dalam kompartemen encer dalam sel dan dalam cairan ekstraseluler. Askorbat melindungi membran melalui dua mekanisme. Pertama, askorbat bereaksi dengan radikal peroksil yang terbentuk dalam sitoplasma sebelum bertemu dengan membran, dengan demikian mencegah peroksidasi lipid. (2). Kedua, askorbat meningkatkan aktivitas antioksidan vitamin E dengan mengubah vitamin E yang telah teroksidasi kembali ke bentuk aktif semula. (13)

Gambar 3. Asam askorbat



Keterangan :

AsCH⁻ = Asam askorbat

R[•] = Molekul radikal

II. 4 Senyawa dikarbonil

Gugus karbonil (>CO) terdiri atas sebuah atom karbon yang dihubungkan dengan sebuah atom oksigen dengan ikatan ganda. Jika

gugus karbonil itu berada pada ujung kerangka karbon, senyawa organik itu disebut aldehid, kalau tidak senyawa itu disebut keton. Keton yang paling sederhana adalah aseton, yang panjangnya tiga karbon. (24)

Terdapat tiga sumber pembentukan senyawa karbonil pada kerusakan protein yaitu, kerusakan spesifik protein dikatalisis ion logam transisi, radiasi dan pajanan terhadap ozon (19).

Senyawa karbonil protein menggambarkan kerusakan oksidatif protein dengan fungsi yang tak dapat diperbaiki dan menjadi akar penyakit ketuaan (33). Penyakit-penyakit yang berhubungan adalah alzheimer, katarak, radang sendi dan progeria (26).

Senyawa karbonil dapat diukur melalui metode yang sensitive , terutama menggunakan 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH), yang bereaksi dengan karbonil menghasilkan dinitrophenylhydrazones yang absorbansinya dapat diukur melalui spektrofotometer (27).

II. 5 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittans dan absorbans suatu contoh sebagai fungsi panjang gelombang; pengukuran terhadap suatu deretan contoh pada suatu panjang gelombang tunggal mungkin dapat juga dilakukan. (28)

II. 5. 1 Prinsip Dasar

Apabila radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan sinar tampak melalui senyawa yang memiliki ikatan-ikatan rangkap, sebagian dari radiasi biasanya diserap oleh senyawa. Jumlah radiasi yang diserap

tergantung pada panjang gelombang radiasi dan struktur senyawa. Penyerapan sinar radiasi disebabkan oleh pengurangan energi dari sinar radiasi pada saat elektron-elektron dalam orbital berenergi rendah tereksitasi ke orbital berenergi lebih tinggi (29).

Hubungan antara kadar dengan intensitas sinar yang diserap oleh contoh yang dianalisis dinyatakan oleh hukum Lambert-Beer :(28)

$$\text{Log } I_0/I = A = a \cdot b \cdot C$$

Dimana :

I_0 = intensitas sinar sebelum melewati contoh

I = intensitas sinar setelah melewati contoh

A = absorban

a = absorpsifitas molekul

b = ketebalan kuvet

c = konsentrasi larutan

oleh karena a dan b nilainya tetap (wadah yang dipakai spesifik), maka A berbanding lurus dengan c (konsentrasi larutan). Dalam penurunan hukum ini dianggap bahwa, (1) radiasi yang masuk adalah monokromatik, (2) spesies penyerap berkelakuan tidak tergantung satu terhadap lainnya dalam proses penyerapan, (3) penyerapan terjadi dalam volume yang mempunyai luas penampang yang sama, (4) dengan radiasi tenaga adalah cepat (tidak terjadi fluoresensi), dan (5) indeks bias tak tergantung pada konsentrasi (tidak berlaku pada konsentrasi yang tinggi) (30).

Untuk penentuan kadar spektrofotometri, yang ditentukan adalah absorpsi maksimum kurva absorpsi. Jika absorpsi ini untuk penentuan

kadar sangat rendah atau senyawa mula-mula mengabsorpsi di bawah 220 nm, maka seringkali senyawa diubah dulu menjadi suatu zat warna melalui reaksi kimia dan absorpsi ditentukan dalam daerah sinar tampak. (31)

II. 5. 2 Serapan oleh Senyawa

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet dan terlihat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra ultraviolet dan visible dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Oleh karena itu, serapan radiasi ultraviolet/visible sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi biasanya antara orbital ikatan atau orbital pasangan bebas dan orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital-orbital yang bersangkutan. Pemisahan tenaga yang paling tinggi diperoleh bila elektron-elektron dalam ikatan π tereksitasi yang menimbulkan serapan dalam daerah dari 120 hingga 200 nm. Daerah ini dikenal sebagai daerah ultraviolet vakum dan relatif tidak banyak memberikan keterangan. Diatas 200 nm, eksitasi elektron dari orbital-orbital p dan d dan orbital π terutama sistem terkonjugasi π segera dapat diukur dan spektrum yang diperoleh memberikan banyak keterangan. Meskipun demikian, terdapat keuntungan yang selektif dari serapan ultraviolet yaitu gugus-gugus karakteristik dapat dikenal dalam molekul-molekul yang sangat kompleks. Sebagian besar dari molekul yang relatif kompleks mungkin transparan

dalam ultraviolet sehingga kita mungkin memperoleh spektrum yang bermacam dari molekul yang sederhana (31).

Spektrum ultraviolet adalah gambar antara panjang gelombang atau frekuensi serapan lawan intensitas serapan (transmitasi atau absorbansi). Sering juga data ditunjukkan sebagai gambar grafik atau tabel yang menyatakan panjang gelombang lawan serapan molar atau log dari serapan molar (28).

II. 5. 3 Peralatan Spektrofotometer

Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi (31) :

1. Sumber tenaga radiasi

Sumber radiasi yang ideal untuk pengukuran serapan harus menghasilkan spektrum kontinu dengan intensitas yang seragam pada keseluruhan kisaran panjang gelombang yang sedang diamati. Sumber-sumber radiasi UV yang kebanyakan digunakan adalah lampu hidrogen. Dan lampu deuterium. Terdiri dari sepasang elektroda yang terselubung dalam tabung gelas dan diisi dengan gas hidrogen atau deuterium pada tekanan yang rendah dengan panjang gelombang 180-350 nm dan digunakan juga lampu xenon, tetapi lampu xenon tidak se-stabil lampu hidrogen.

2. Monokromator

Dalam spektrofotometer, radiasi polikromatik diubah menjadi monokromatik. Ada dua jenis alat yang digunakan yaitu penyaring dan monokromator. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang

menguraikan radiasi polikromatik menjadi jalur-jalur yang efektif atau panjang gelombang tunggal.

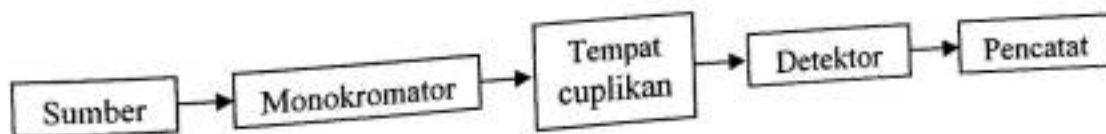
3. Tempat cuplikan

Larutan ditempatkan dalam sel atau kuvet. Untuk daerah visibel digunakan gelas biasa atau quartz. Sel untuk larutan mempunyai panjang 1-10 cm. Sebelum sel dipakai, harus dibersihkan dengan air atau jika dikehendaki dapat dicuci dengan larutan deterjen atau asam nitrat panas.

4. Detektor dan pencatat

Detektor menyerap tenaga foton yang mengenai cuplikan dan merubah tenaga tersebut untuk diukur secara kuantitatif seperti sebagai arus listrik atau perubahan-perubahan panas. Kebanyakan detektor menghasilkan sinyal listrik yang dapat mengaktifkan meter atau pencatat.

Gambar 4. Diagram sederhana spektrofotometer



BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah alat maserasi, gelas ukur, inkubator suhu 37°C, labu tentukur, neraca analitik, pH meter, pipet mikrometer, pipet volume, sentrifugasi, spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah asam trikloroasetat (TCA) p.a, asam asetat, asam klorida (HCl) p.a, beta karoten murni, *bovine serum albumine* (BSA), dapar fosfat 1 M pH 7,4, 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) p.a, etanol-etil asetat, Fe- EDTA, hidrogen peroksida (H₂ O₂) p.a, natrium hidroksida (NaOH) p.a, urea

III.2 Penyiapan Bahan Penelitian

III.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel buah alpukat diambil di kota Makassar, Sulawesi Selatan

III.2.2 Penyiapan sampel

Buah alpukat diambil yang sudah besar dan sudah tua tapi belum terlalu matang. Buah dibersihkan, dibelah dua lalu bijinya dikeluarkan. Selanjutnya daging buah dihaluskan.

Sampel daging buah masing-masing ditimbang sebanyak 25 gram dan 50 gram lalu ditambah dengan pelarut etanol 96% hingga 100 ml. Selanjutnya disaring dan diambil filtratnya.

III.3 Penyiapan pereaksi

III.3.1 Pereaksi 2,4 Dinitrophenylhidrazin (DNPH) 10 mM dalam HCl 2,5 M.

DNPH sebanyak 99 mg dilarutkan dalam 50 ml HCl 2,5 M.

III.3.2 Pereaksi Fe-EDTA

FeSO₄.7H₂O 100 µM sebanyak 10 ml dicampur dengan 10 ml larutan Na₂EDTA 100 µM.

III.3.3 TCA 10 % dan TCA 20%

Trichloroacetat acid (TCA) masing-masing 10 gram dan 20 gram dilarutkan dalam 100 ml HCl 0,125N sehingga diperoleh konsentrasi 10% dan 20%.

III.4 Prosedur Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH)

Disiapkan empat buah tabung reaksi yakni tabung I, II, III, dan IV. Tabung I berisi dapar fosfat 1M pH 7,4 (larutan kontrol negatif), tabung II berisi beta karoten 0,05% (larutan kontrol positif) dan tabung III berisi sari etanol alpukat 25% dan tabung IV berisi sari etanol alpukat 50% (larutan sampel). Kedalam tabung II, III, dan IV ditambahkan 0,49 ml buffer fosfat pH 7,4 kemudian ke dalam empat tabung tersebut ditambahkan BSA 30% sebesar 0,50 ml. Keempat tabung reaksi ditambahkan Fe-EDTA sebanyak 0,2 ml dan 0,2 ml H₂O₂ 10 mmol/ltr. Setelah itu keenam tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Masing-masing tabung diambil 0,5 ml dan ditambahkan DNPH sebanyak 2 ml kemudian diinkubasi

selama 45 menit dalam ruangan terlindung cahaya dan divortex tiap 15 menit. Selanjutnya ditambahkan 2 ml TCA 20% pada keenam tabung dan dinkubasi dalam es selama 5 menit kemudian disentrifugasi 10 menit dan supernatan dibuang. TCA 10% sebanyak 2 ml ditambahkan ke dalam empat tabung dan disentrifugasi selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Etanol-etil asetat sebanyak 2 ml ditambahkan pada keenam tabung, disentrifugasi selama 10 menit dan dibuang supernatannya kemudian diulangi sebanyak 3 kali. Selanjutnya pada keempat tabung ditambahkan 1 ml urea 9 M dalam NaOH 0,4 N dan dinkubasi 37°C selama 10 menit sambil dikocok dan disentrifugasi selama 10 menit. Absorbansi larutan pada keenam tabung tersebut diukur pada $\lambda = 390 \text{ nm}$. Perhitungan aktivitas antioksidan dengan rumus :

$$AOA = \frac{(\Delta K - \Delta A)}{(\Delta K - \Delta AU)} \times 100\%$$

Keterangan:

AOA = Aktivitas antioksidan (%)

ΔK = absorbansi kontrol

ΔA = absorbansi sampel

ΔAU = absorbansi beta karoten

III.5 Pengumpulan dan Analisis Data

Data dari hasil penelitian dikumpulkan dan dilakukan analisis data

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Dari hasil penelitian diperoleh aktivitas antioksidan rata-rata sari etanol 25% adalah sebesar 207,203% sedangkan sari etanol 50% aktivitas rata-rata antioksidannya lebih besar yakni 232,041%.

IV.2 Pembahasan

Pada penelitian ini telah dilakukan penentuan aktivitas antioksidan buah alpukat (*Persea americana* Mill) yang disari dengan pelarut etanol 96% yang selanjutnya akan diuji. Buah alpukat banyak mengandung senyawa-senyawa yang berkhasiat antioksidan yang bersifat non polar (larut lemak) antara lain vitamin A dan E, namun juga mengandung senyawa-senyawa polar (larut air) antara lain vitamin B, vitamin C, dan flavanoid.

Uji potensi antioksidan buah alpukat diukur secara spektrofotometer dengan metode DNPH yang dimodifikasi. Mula-mula disiapkan empat buah tabung yakni tabung I, II, III, dan IV. Tabung I adalah kontrol negatif yang hanya berisi pereaksi (mengandung radikal bebas), tabung II adalah kontrol positif yang berisi pereaksi dan pembanding beta karoten 0,05%, sedangkan tabung III dan IV adalah larutan uji yang berisi pereaksi dan sampel sari etanol 25% dan 50%. Masing-masing tabung yang akan diuji ditambah dengan dengan dapar posfat pH 7,4. Selanjutnya sampel

posfat pH 7,4. Selanjutnya sampel ditambah dengan *Bovine serum albumine* (BSA) 30% sebagai sumber protein. Didalam BSA terkandung asam-asam amino antara lain triptofan dan metionin dalam jumlah kecil, sejumlah besar sistein, dan asam-asam amino lain seperti aspartat, asam glutamat, lisin dan arginin. Sedangkan kandungan glisin dan isoleusinya lebih rendah dibandingkan dengan protein lainnya. Selanjutnya BSA tersebut akan bereaksi dengan radikal bebas hidroksil yang dihasilkan dari reaksi antara Fe-EDTA dengan hidrogen peroksida. Larutan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama satu jam untuk bereaksi membentuk senyawa dikarbonil.

Selanjutnya dari masing-masing larutan diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambah dengan senyawa 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH) untuk mendeteksi adanya senyawa dikarbonil dalam larutan. Senyawa 2,4 Dinitrofenilhidrazin (DNPH) adalah senyawa yang digunakan hanya untuk mendeteksi adanya gugus karbonil yang ada dalam suatu senyawa baik gugus aldehid atau keton. Adapun penggunaan senyawa trikloroasetat (TCA) adalah untuk mengendapkan protein yang ada dalam larutan. Selanjutnya protein yang sudah mengendap tersebut dicuci kembali dengan etanol-etil asetat sebanyak tiga kali.

Prinsip dasar pengukuran didasarkan atas kemampuan suatu bahan kimia dalam menghambat pembentukan senyawa dikarbonil hasil oksidasi protein akibat adanya radikal bebas OH^{\cdot} . Radikal bebas hidroksil diperoleh dari pereaksi Fenton yakni hasil reaksi antara hidrogen

peroksida dengan suatu logam. Logam yang digunakan disini adalah Fe^{2+} . Radikal OH^{\cdot} merupakan radikal bebas yang paling toksik tetapi memiliki masa hidup yang singkat.

Molekul protein terdiri atas dua bagian besar. Bagian pertama terbentuk dari rangkaian ikatan atom C dan N yang menyusun ikatan peptida dan menjadi tulang punggung molekul protein. Ikatan ini sama bagi seluruh protein apapun. Bagian kedua adalah berbagai macam rantai samping R. Rantai R sangat menentukan fungsi biologis suatu protein. Kedua bagian ini dapat menjadi sasaran pengrusakan oleh radikal bebas.

Pada proses kerusakan ini, rantai peptida akan berubah menjadi senyawa karbonil, demikian pula halnya dengan rantai samping. Rantai samping yang paling mudah mengalami kerusakan akibat radikal bebas adalah rantai samping dari asam-asam amino arginin, histidin, lisin, dan prolin. Terdapat tiga sumber pembentukan senyawa karbonil pada kerusakan protein yaitu, kerusakan spesifik protein dikatalisis ion logam transisi, radiasi dan paparan terhadap ozon .

DNPH bereaksi dengan kelompok dikarbonil untuk membentuk dinitrofenilhidrazon yang jumlahnya dapat diketahui secara spektrofotometris dengan karakteristik penyerapan maksimal pada 360-390 nm. Banyak sedikitnya jumlah dikarbonil ini menggambarkan banyak atau sedikitnya jumlah kerusakan protein yang terjadi yang bisa dilihat pada nilai absorbansi. Makin tinggi nilai absorbansi menunjukkan makin banyak jumlah senyawa dikarbonil yang terbentuk yang berarti adanya kerusakan suatu protein, demikian pula sebaliknya penurunan nilai

absorbansi menunjukkan penurunan jumlah senyawa dikarbonil yang terbentuk. Penurunan ini dapat disebabkan oleh adanya suatu senyawa kimia yang bersifat sebagai antioksidan.

Pengukuran potensi antioksidan buah alpukat ini dilakukan dengan menggunakan dua konsentrasi yakni 25% dan 50%. Dari hasil penelitian diperoleh nilai absorbansi larutan sari etanol lebih kecil daripada larutan kontrol negatif. Demikian pula hanya pada kontrol positif menunjukkan nilai absorbansi yang lebih rendah daripada kontrol negatif. Hal ini diakibatkan karena radikal bebas hidroksil yang terbentuk dapat diikat oleh senyawa yang ada dalam sari etanol yang menyebabkan jumlah senyawa dikarbonil berkurang. Dari hasil perhitungan diperoleh aktivitas antioksidan sari etanol 25% sebesar 207,203% sedangkan sari etanol 50% sebesar 232,041%. Nilai aktivitas antioksidan diatas 100% ini menunjukkan bahwa sari etanol alpukat 25% dan 50% memiliki aktivitas antioksidan yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol positif betakaroten 0,05%, terbukti dari serapan sari etanol lebih kecil daripada beta karoten. Nilai tersebut bisa saja menurun dibawah 100% jika beta karoten yang digunakan ditingkatkan konsentrasinya diatas 0,05% untuk mendapatkan nilai serapan yang lebih kecil daripada sampel jika digunakan konsentrasi sampel yang tetap.

Mekanisme penghambatan oleh sari etanol buah alpukat ini diduga melalui cara antioksidan radical traps dan molekul scavenger, yakni yang diperankan oleh asam askorbat dan karotenoid yang terkandung dalam ekstrak. Asam askorbat atau vitamin C mempunyai sifat polaritas yang

tinggi karena banyak mengandung gugus hidroksil sehingga mudah larut dalam air. Vitamin C mudah mengalami proses oksidasi sehingga terbentuk radikal askorbat yang selanjutnya bereaksi dengan NADH untuk membentuk asam askorbat kembali. Oleh sebab itu vitamin C (asam askorbat) mampu menetralkan OH^{\cdot} yang terbentuk dari reaksi Fenton . Demikian juga karotenoid, selain mencegah pembentukan radikal hidroksil sebagai antioksidan perannya terutama mencegah pembentukan oksigen singlet, sehingga kerusakan protein dapat dicegah. Akibatnya, senyawa dikarbonil menjadi lebih rendah daripada yang tidak diberi antioksidan.

Hasil penelitian tersebut juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Vojiyan, tetapi antioksidan yang digunakannya adalah piridoksamin. Piridoksamin dalam hal ini berperan sebagai kelator sehingga pembentukan senyawa dikarbonil terhambat. Pada penelitian ini mekanisme penghambatannya diperankan oleh vitamin C dan karotenoid yang terkandung dalam buah alpukat melalui perannya sebagai antioksidan dan peredam senyawa radikal bebas (*molecule scavenger*).

Senyawa dikarbonil protein menggambarkan kerusakan oksidatif protein dengan fungsi yang tak dapat diperbaiki dan menjadi akar penyakit ketuaan . Penyakit-penyakit yang berhubungan adalah alzheimer, katarak, radang sendi.

tinggi karena banyak mengandung gugus hidroksil sehingga mudah larut dalam air. Vitamin C mudah mengalami proses oksidasi sehingga terbentuk radikal askorbat yang selanjutnya bereaksi dengan NADH untuk membentuk asam askorbat kembali. Oleh sebab itu vitamin C (asam askorbat) mampu menetralkan OH^{\cdot} yang terbentuk dari reaksi Fenton. Demikian juga karotenoid, selain mencegah pembentukan radikal hidroksil sebagai antioksidan perannya terutama mencegah pembentukan oksigen singlet, sehingga kerusakan protein dapat dicegah. Akibatnya, senyawa dikarbonil menjadi lebih rendah daripada yang tidak diberi antioksidan.

Hasil penelitian tersebut juga sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Vojiyan, tetapi antioksidan yang digunakannya adalah piridoksamin. Piridoksamin dalam hal ini berperan sebagai kelator sehingga pembentukan senyawa dikarbonil terhambat. Pada penelitian ini mekanisme penghambatannya diperankan oleh vitamin C dan karotenoid yang terkandung dalam buah alpukat melalui perannya sebagai antioksidan dan peredam senyawa radikal bebas (*molecule scavenger*).

Senyawa dikarbonil protein menggambarkan kerusakan oksidatif protein dengan fungsi yang tak dapat diperbaiki dan menjadi akar penyakit ketuaan. Penyakit-penyakit yang berhubungan adalah alzheimer, katarak, radang sendi.

BAB V

PENUTUP

V.1 Kesimpulan

Sari etanol alpukat pada konsentrasi 25% dan 50% bersifat sebagai antioksidan dengan menghambat pembentukan senyawa dikarbonil dengan aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 207,203% dan 232,041%

V.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian terhadap penghambatan pembentukan *advance glycation end product* (AGES) yang spesifik terhadap penderita diabetes mellitus

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim. 2005. *Antara Alpukat dan Stroke* http://groups.yahoo.com/group/ex_st_aloysius, diakses tanggal 06 Mei 2006
2. Mckee, Trudy., Mckee, James R, 2003. *Biochemistry*. Mc Graw Hill. New York. 320
3. Slaga, Thomas J., Keuneke, Robin, *The Detox Revolution*, Terjemahan oleh Lea Roosa, 2005. PT Bhuana Ilmu Populer. Jakarta. 16
4. Tjay,T,H., Rahardja, K, 2002. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. Edisi Relima. PT Gramedia. Jakarta.218. 219
5. Suhartono, Eko., Setiawan, Bambang., Edyson., Ramlah, 2005. Uji Aktivitas Antioksidan Jus Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan Perannya Sebagai Inhibitor Advanced Glycation End Products (AGEs) Akibat Reaksi Glikosilasi. *Berkala Ilmu Kedokteran*. Vol.37 no.1.
6. Tjitrosoepomo, Gembong. 1994. Taksonomi Tumbuhan Obat-Obatan. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 183
7. Wijayakusuma, H., Dalimartha, Setiawan., Wirian A.S. 1998. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jilid ke- 4. Pustaka Kartini. Jakarta. 19,20
8. Badan Pengawas Obat dan Makanan. 2005. *Mengenal Beberapa Tanaman yang Digunakan sebagai Antidiabetika.. Informasi@pom.go.id*. Diakses 06 Mei 2006
9. Republika Online. 2002. *Buah Alpukat Mengatasi Darah Tinggi*. webadm@litbang.deptan.go.id. Diakses 06 Mei 2006.
10. Harli, Mohammad. 2001. Alpukat Sehat Untuk Penderita HIV/AIDS (www.kompas.com, diakses 5 Mei 2006.)
11. Murray, Robert K., Granner, Daryl K., Mayes, Peter A., Rodwell, Victor W, 2000. *Biokimia Harper*. Terjemahan oleh Andry Hartono, 2003. Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta. 613, 618-619
12. Lautan, Jensen. 1997. *Radikal Bebas Pada Eritrosit dan Lekosit*. Cermin Dunia Kedokteran No.116

13. Husaini, M.A. 1991. Gizo, *Proses Penuaan dan umur Panjang*. Majalah Cermin Dunia Kedokteran No. 73 : 22,23
14. Muhilal. 1991. *Teori Radikal Bebas dalam Gizi dan Kedokteran*. Majalah Cermin Dunia Kedokteran No. 73 : 10
15. Posman Sibuea. 2004. *THP Unika St Thomas Medan, Senjata Pemusnah Radikal Bebas*. www.kompas.com, diakses 10 Februari 2006.
16. Winarno, F. G., 1997, *Kimia Pangan dan Gizi*, PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta, 12
17. Rohman, Abd dan Sugeng R., 2005, *Jurnal Aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH Minyak buah merah Daun Kemuning (Murraya paniculata (L) Jack) secara In Vitro*, Majalah Farmasi Indonesia. Lab. Kimia Analisis, Bagian kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 136-140
18. Sadikin, N. Antioksidan eksogen dan penilaian status antioksidan. Disampaikan pada Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam, Jakarta, 24 Maret 2001
19. Halliwell, Barry dan John MC Gutteridge. *Free Radical in Biology and Medicine 3rd edition*. London: Oxford University Press, 1999.
20. Soewoto H. Antioksidan eksogen sebagai lini pertahanan kedua dalam menanggulangi peran radikal bebas. Disampaikan pada Kursus Penyegar Radikal Bebas dan Antioksidan dalam Kesehatan: Dasar, Aplikasi dan Pemanfaatan Bahan Alam, Jakarta, 24 Maret 2001.
21. Soeatmadji DJ. The role of free radicals in management of type 2 diabetic patients. Disampaikan pada *Simposium Free Radicals in Diabetes and Their Interaction with Sulfonilurea*, Jakarta, 24 Maret 2001.
22. Peppia M, Uribari J dan Vlassara HI. 2003. Glucose, Advanced Glycation End Products, and Diabetes Complications: What Is New and Whats Works. *Clinical Diabetes* 2003
23. Bayness JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complication: Anew perspective an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.

24. Campbell, Neil A., Reece, Jane B., Mitchell, Mitchell, Lawrence G. 1974, *Biologi*, Terjemahan oleh Rahayu Lestari, 1999, Penerbit Erlangga, 59
25. Berlett, Barbara S dan Earl RS. Protein Oxidation in Aging, Disease and Oxidative Strees. *J. Biol Chem* 1997; 272(33): 20313-20316.
26. Requena JR, Chao CC, Levine RL dan Stadtman ER. Glutamic and amino adipic semialdehyds are the main carbonyl products of metalcatalyzed oxidation of protein. *Proc. Natl. Acad. Sei* 2001; 98: 69-74.
27. Suwandi, Usman. 1991. Manfaat Beta-Karoten bagi Kesehatan. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran No. 73* : 37
28. Day, Jr. R. A., and Underwood, A. L., terjemahan oleh R. Soendoro, 1989, *Analisis Kimia Kuntitatif*, edisi kelima, Penerbit Erlangga, Jakarta, 383-417.
- 29 Solomons, T. W. G., 1980, *Organic Chemistry*, 2nd edition, University of South Flourida, John Wiley and Sons, New York, 413.
30. Sastrohamidjojo, H., 1985, *Spektroskopi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta. 11-15
31. Roth., J.H & Blaschke. 1994. Analisis Farmasi. Terjemahan oleh Kisman.,S & Ibrahim.,S. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 374