

**UJI AKTIVITAS PENGIKATAN RADIKAL BEBAS
NITRIT OKSIDA (NO*) EKSTRAK KLIKA ONGKEA
(*Mezzetia parviflora* Becc.) SECARA IN VITRO**



**FADLI HUSAIN
N111 05 218**



PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS HASANUDDIN	
Tgl. Terima	
Asal	
Banyaknya	
Harga	
No. Inventaris	
No. Klas.	S.KR-F10

HUS
U

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

**UJI AKTIVITAS PENGIKATAN RADIKAL BEBAS
NITRIT OKSIDA (NO*) EKSTRAK KLIKA ONGKEA
(*Mezzetia parviflora* Becc.) SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**FADLI HUSAIN
N111 05 218**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2010**

UJI AKTIVITAS PENGIKATAN RADIKAL BEBAS
NITRIT OKSIDA (NO*) EKSTRAK KLIKA ONGKEA
(*Mezzetia parviflora* Becc.) SECARA IN VITRO

FADLI HUSAIN

N111 05 218

Disetujui oleh:

Pembimbing Utama,



Mufidah, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19730309 199903 2 002

Pembimbing Pertama,



Nur'ain Thomas, S.Si., Apt.
NIP.19821231 200801 2 012

Pada tanggal Mei 2010

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, Puji syukur ke hadirat Allah SWT karena atas perkenannya juaah, sehingga penelitian dengan judul "Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas Nitrit Oksida Ekstrak Klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) Secara In Vitro telah rampung sebagai skripsi pada Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Dalam rangka penyusunan skripsi ini banyak kendala yang dihadapi penulis, namun berkat bantuan serta dukungan yang telah diberikan oleh berbagai pihak akhirnya kendala-kendala tersebut dapat dilewati dengan baik. Oleh karena itu, atas berbagai bantuan serta dukungan tersebut, penulis menghaturkan banyak terima kasih.

Terima kasih penulis ucapkan pada:

1. Ibu Prof. Dr. Elly Wahyudin, DEA, Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Unhas,
2. Ibu Mufidah, S.Si., M.Si., Apt, sebagai pembimbing utama yang ditengah kesibukannya telah membimbing, memberi saran serta kritikan yang menjadi pemicu semangat,
3. Ibu Nur'ain Thomas, S.Si, Apt, sebagai pembimbing pertama yang telah membimbing serta membuktikan bahwa jarak bukanlah hambatan dalam berkarya selama kita berusaha,

4. Bapak Drs. Hi. Ali Kaku, M.Pd, selaku ketua program Kerjasama Farmasi UNG-UNHAS, semoga kerjasama antara UNHAS dengan UNG dapat lebih ditingkatkan lagi ditahun-tahun mendatang,
5. Bapak ibu dosen serta seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, atas curahan ilmu pengetahuan dan segala bantuan yang diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan, penelitian, hingga selesainya skripsi ini,
6. Bapak ibu dosen serta seluruh staf Fakultas MIPA Universitas Negeri Gorontalo, atas limpahan ilmu serta bantuan yang telah diberikan,
7. Kak Rusdi, atas bimbingan, masukan, waktu, energi, serta semangatnya.
8. Kepada teman-teman angkatan 2005 UNG-UNHAS, yang senantiasa memberiku semangat dan dukungan,
9. Anak-anak Puri Taman Sari L2/5 yang membuatku memahami makna persahabatan.

Terima kasih tak terhingga istimewanya terhatur buat ayahanda Yasin Husain dan ibunda Rohani Yunus atas jerih payah dan doa terhadap penulis, juga kepada adik penulis Fandi Husain, terima kasih atas kesabaran, penantian, serta doa kalian, semua ini persembahanku untuk kalian.

Semoga Allah swt. senantiasa memberikan berkah dan hidayah-Nya kepada kita sekalian. Amin.

Makassar, 2010

FADLI HUSAIN

ABSTRAK

Penelitian uji aktivitas pengikatan radikal bebas Nitrit Oksida (NO^{\bullet}) dari ekstrak klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas pengikatan radikal bebas NO^{\bullet} dari ekstrak etanol dan ekstrak tidak larut aseton dari klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) dengan metode NO^{\bullet} scavenging. Klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) diekstraksi dengan etanol 70% menggunakan metode maserasi, lalu diekstraksi cair padat dengan aseton. Metode NO^{\bullet} scavenging didasarkan pada pengukuran NO^{\bullet} yang dihasilkan dari Na-nitroprusid dan diukur dengan pereaksi Greiss. Aktivitas pengikatan dari ekstrak-ekstrak tersebut dibandingkan dengan vitamin C sebagai kontrol positif. Ekstrak etanol dan ekstrak tidak larut aseton dari klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) memiliki nilai IC_{50} berturut turut 229,09 ppm dan 316,23 ppm, tetapi potensi ini jauh lebih rendah dibanding dengan vitamin C yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 38,01 ppm.



ABSTRACT

A research concerning Nitric Oxide (NO^{\bullet}) radical scavenging by extract of Ongkea woodbark (*Mezzetia parviflora* Becc.) has been done. The aim of this study was to know NO^{\bullet} free radical scavenging activities of ethanol extract and undissolved aceton extract from Ongkea woodbark (*Mezzetia parviflora* Becc.) using NO^{\bullet} scavenging method. The Ongkea woodbark (*Mezzetia parviflora* Becc.) was extracted with ethanol using maceration method, then partitioned with acetone. The NO^{\bullet} scavenging method based on the measurement of NO^{\bullet} that is generated from sodium nitroprusside and measured by the Greiss reaction. All these scavenging activities were compared with vitamin C as positive control. The IC_{50} of ethanol extract and undissolved aceton extract from Ongkea cortex (*Mezzetia parviflora* Becc.) were 229.09 ppm and 316.23 ppm, respectively, but this potency were lower than Vitamin C activity, which have IC_{50} 38.01 ppm.

DAFTAR ISI

	halaman
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 Uraian Tanaman	3
II.1.1 Klasifikasi Tanaman	3
II.1.2 Nama Daerah	3
II.1.3 Morfologi Tanaman	3
II.1.4 Kandungan Kimia	4
II.1.5 Kegunaan Tanaman	4
II.2 Uraian Umum	4
II.2.1 Radikal Bebas dan Antioksidan	4
II.2.1.1 Pengertian	4
II.2.1.2 Sumber Radikal Bebas	11
II.2.1.3 Pembentukan radikal bebas	13
II.2.1.4 Klasifikasi Antioksidan	13
II.2.1.5 Mekanisme Antioksidan	16

II.2.2 Nitrit Oksida (NO^\bullet)	18
II.2.3 Vitamin C	21
II.3 Uji Aktivitas Antiradikal Bebas	24
II.3.1 Metode DPPH	24
II.3.2 Metode Linoleat-Tiosianat	24
II.3.3 Metode Tiosianat	25
II.3.4 Metode DNPH	25
II.3.5 Metode Nitrit Oksida	26
II.4 Metode Ekstraksi Bahan Alam	26
II.4.1 Definisi Ekstrak	26
II.4.2 Ekstraksi	27
II.4.3 Jenis-Jenis Ekstraksi	27
II.5 Spektrofotometer UV-VIS	27
II.5.1 Prinsip	28
II.5.2 Absorpsi oleh senyawa	29
II.5.3 Peralatan Spektrofotometer	29
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	31
III.1 Alat dan Bahan	31
III.2 Penyiapan Sampel	31
III.3 Ekstraksi dan Partisi	31
III.4 Prosedur Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas	32
III.4.1 Pembuatan Larutan stok sampel	32
III.4.2 Pembuatan Larutan stok asam askorbat.....	32

III.4.3 Pembuatan Buffer Fosfat pH 7.4	32
III.4.4 Pembuatan Reagen Griess	33
III.4.5 Pembuatan Na-nitroprusid 5 mM	33
III.4.6 Pelaksanaan Uji Aktivitas	33
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	34
IV.1 Hasil Penelitian	34
IV.2 Pembahasan	35
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	37
V.1 Kesimpulan	37
V.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN	41

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Harga probit sesuai persentasenya	41
2. Hasil pengukuran serapan NO [•] yang terikat oleh ekstrak tidak larut aseton	42
3. Hasil pengukuran serapan NO [•] yang terikat oleh ekstrak awal (etanol)	43
4. Hasil pengukuran serapan NO [•] yang terikat oleh vitamin C	44
5. Hasil Perhitungan IC ₅₀	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Struktur dari Radikal Bebas	5
2. Efek NO [•]	19
3. Beberapa Reaksi dari NO [•]	20
4. Struktur vitamin C	21
5. Diagram sederhana Spektrofotometer	30
6. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh ekstrak tidak larut aseton	46
7. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh ekstrak etanol	46
8. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh vitamin C	47
9. Tanaman Ongkea (<i>Mezzetia parviflora</i> Becc.)	47



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema Kerja Ekstraksi dan Partisi	48
2. Skema Kerja Uji Aktivitas Radikal Bebas NO [•]	49
3. Contoh Perhitungan Daya Antiradikal Bebas	50
4. Contoh perhitungan IC ₅₀	51

BAB I

PENDAHULUAN

Dewasa ini dunia kedokteran dan kesehatan banyak membahas tentang radikal bebas dan antioksidan. Hal ini terjadi karena sebagian besar penyakit diawali oleh adanya reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Radikal bebas berperan dalam terjadinya berbagai penyakit. Hal ini dikarenakan radikal bebas memiliki pasangan elektron bebas di kulit terluar sehingga sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, atau DNA. Reaksi oksidasi mencetuskan terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif, yang dapat merusak struktur serta fungsi sel. Namun, reaktivitas radikal bebas itu dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh (1,2).

Nitrit Oksida (NO^*) adalah suatu mediator kimia penting yang dihasilkan oleh sel-sel endotelial, makrofag, serta neuron-neuron. Produksi berlebih dari NO^* dapat menyebabkan efek toksik seperti fragmentasi DNA, kerusakan sel, dan kematian sel neuronal. NO^* tidak berinteraksi dengan makromolekul bioorganik seperti DNA atau protein secara langsung. Walaupun demikian, pada kondisi aerobik, molekul NO^* sangat tidak stabil dan bereaksi dengan oksigen untuk memproduksi (3).

Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi antioksidan fenolik alami yang terdapat dalam buah, sayur mayur,

dan tanaman serta produk-produknya mempunyai manfaat besar terhadap kesehatan yakni dapat mengurangi resiko terjadinya penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Sumber utama antioksidan alami terdapat pada jamur, buah, dan sayur. Antioksidan yang bersumber dari tanaman seperti vitamin C, vitamin E, serta karoten telah diketahui berpotensi mengurangi resiko penyakit, antara lain kanker dan kardiovaskular (2).

Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) adalah salah satu tanaman familia Annonaceae yang oleh masyarakat Sulawesi Tenggara secara empiris digunakan untuk mengobati berbagai penyakit degeneratif antara lain antihiperkolesterol, antidiabetes dan antiinfeksi (4).

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Abdul Rahman (2008) didapatkan bahwa fraksi klica Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) yang aktif mengikat radikal bebas DPPH secara in vitro adalah fraksi III dan IV dengan nilai IC_{50} masing-masing sebesar 7,31 ppm dan 8,31 ppm.

Penelitian ini adalah penelitian lanjutan yang bertujuan untuk menguji aktivitas pengikatan radikal bebas ekstrak klica Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) dengan metode pengikatan NO^* .

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Tanaman *Mezzetia parviflora* Becc.

II.1.1 Klasifikasi

Regnum	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Class	: Angiospermae
Subclass	: Dialypetalae
Ordo	: Ranales
Famili	: Annonaceae
Genus	: Mezzetia
Spesies	: <i>Mezzetia parviflora</i> Becc. (5).

II.1.2 Nama Daerah

Buton	: Ongkea
Palembang	: Makai
Bangka	: Limang (6)
Sabah	: Karai (7).

II.1.3 Morfologi

Mezzetia sp. merupakan pohon tinggi, dengan ketinggian sampai 30 meter dan diameter batang 90 cm, di Sumatera Selatan sering ditemukan di daerah pantai. Batangnya tumbuh tegak lurus, bulat, menghasilkan kayu yang agak berat tetapi mudah dikerjakan, warna kayu

putih kotor, dari kayu tersebut dapat dibuat papan yang digunakan dalam ruangan. Kulitnya mudah dikupas. Buahnya dapat menyebabkan pusing dan muntah (6).

II.1.4 Kandungan Kimia

Sekitar 75 spesies yang termasuk 50 genus Annonaceae ternyata mengandung alkaloid. Hampir semua alkaloid yang terdapat pada Annonaceae adalah kelompok isokuinolin.

Annonaceae juga menghasilkan berbagai senyawa non-alkaloid, seperti terpenoid dan flavonoid, disamping minyak atsiri, asam amino, protein, karbohidrat, dan lemak. Senyawa oligoramnosida juga telah dilaporkan ada pada spesies *Mezzetia leptopoda* (8,4)

II.1.5 Kegunaan Tanaman

Ongkea telah digunakan secara turun temurun oleh masyarakat kabupaten Buton sebagai obat diabetes, asma, kolesterol, tekanan darah tinggi, kanker, dan dapat menurunkan berat badan (9).

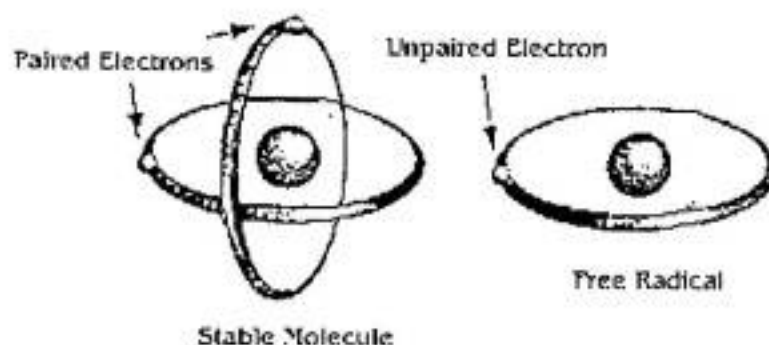
II.2 Uraian Umum

II.2.1 Radikal Bebas dan Antioksidan

II.2.1.1 Pengertian

Menurut Soeatmaji (1998), yang dimaksud radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari

pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada disekitarnya (1).



Gambar 1. Struktur dari Radikal Bebas (Reiter & Jo Robenson, 1995)

Para ahli biokimia menyebutkan bahwa radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Senyawa ini terbentuk di dalam tubuh, dipicu oleh bermacam-macam faktor. Radikal bisa terbentuk, misalnya, ketika komponen makanan diubah menjadi bentuk energi melalui proses metabolisme. Pada proses metabolisme ini sering terjadi kebocoran elektron. Dalam kondisi demikian, mudah sekali terbentuk radikal bebas, seperti anion superoksida, hidroksil, dan lain-lain. Radikal bebas juga dapat terbentuk dari senyawa lain yang sebenarnya bukan radikal bebas, tetapi mudah berubah menjadi radikal bebas. Misalnya, hidrogen peroksida dan ozon. Kedua kelompok senyawa tersebut sering diistilahkan sebagai Senyawa Oksigen Reaktif (ROS) (1).

Secara biokimia, proses pelepasan elektron dari suatu senyawa disebut oksidasi, sementara proses penangkapan elektron disebut reduksi. Senyawa yang dapat menarik atau menerima elektron disebut oksidan atau oksidator, sedangkan senyawa yang dapat melepaskan atau memberikan elektron disebut reduktan atau reduktor (1).

Radikal bebas adalah atom atau kelompok atom yang tidak memiliki pasangan elektron dan dapat terbentuk ketika oksigen berinteraksi dengan molekul. Bentuk radikal reaktif ini dapat memulai reaksi berantai. Bahaya yang dapat ditimbulkan adalah dengan rusaknya komponen-komponen penting sel seperti DNA, atau membran sel. Banyak penyakit diakibatkan reaksi oksidatif dari radikal bebas (10,11). Radikal bebas secara langsung berkaitan dengan oksidasi pada makanan dan sistem biologik, sehingga pengetahuan tentang metode pengikatan radikal bebas sangat penting (12).

Radikal bebas dalam jumlah berlebih dalam tubuh sangat berbahaya karena menyebabkan kerusakan sel, disfungsi, mutasi dan kanker. Radikal bebas dapat menyerang enzim dan protein, mengganggu aktivitas sel normal, atau membran sel, menghasilkan rantai reaksi pengrusakan. Kerusakan membran sel pada pembuluh darah dapat menyebabkan serangan jantung dan stroke (13).

Oksigen merupakan suatu atom yang memiliki reaktivitas tinggi yang berpotensi merusak molekul yang umumnya radikal bebas. Radikal bebas memiliki kemampuan untuk menyerang sel normal dalam tubuh,

memyebabkan sel-sel kehilangan struktur dan fungsinya. Kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas dapat memicu penuaan dan penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit kardiovaskular, katarak, pelemahan sistem imun, dan disfungsi otak. Secara keseluruhan, radikal bebas telah mengimplikasi pada patogenesis 50 penyakit. Antioksidan memiliki kemampuan untuk menstabilkan atau men-deaktivasi radikal bebas sebelum menyerang sel target. Antioksidan mutlak ada dalam tubuh untuk menjaga dan merawat secara optimal sel dan sistem-sistem tubuh lainnya (14).

Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan sistem-sistem dalam tubuh. Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain pada:

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 arterosklerosis. Serangan radikal hidroksil pada asam lemak tak jenuh dimulai dengan interaksi oksigen pada rangkaian sehingga terbentuk lipid hidroperoksida yang selanjutnya merusak bagian sel dimana hidrogen peroksida ini berada.

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.

Kerusakan lipid

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

Peroksida lipid

Lipid dianggap molekul yang paling sensitif terhadap serangan radikal bebas sehingga bisa terbentuk lipid peroksida. Terbentuknya lipid peroksida yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan lain dianggap salah satu penyebab terjadinya berbagai penyakit degeneratif.

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.

Proses penuaan

Dalam teori radikal bebas dapat dimusnahkan 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 penuaan (13).

Sadikin (2001) berpendapat bahwa serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya akan menyebabkan terjadinya reaksi berantai, yang kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Dampak reaktivitas senyawa radikal bebas bermacam-macam, mulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker (1).

Reaktivitas radikal bebas merupakan upaya untuk mencari pasangan elektron. Sebagai dampak kerja radikal bebas tersebut, akan terbentuk radikal bebas baru yang berasal dari atom atau molekul yang elektronnya diambil untuk berpasangan dengan radikal sebelumnya. Namun, bila dua senyawa radikal bertemu, elektron-elektron yang tidak berpasangan dari kedua senyawa tersebut akan bergabung dan membentuk ikatan kovalen yang stabil. Sebaliknya, bila senyawa radikal bebas bertemu dengan senyawa bukan radikal bebas, akan terjadi tiga kemungkinan:

- a. Radikal bebas akan memberikan elektron yang tidak berpasangan kepada senyawa yang bukan radikal bebas,
- b. Radikal bebas menerima elektron dari senyawa bukan radikal bebas,
- c. Radikal bebas bergabung dengan senyawa bukan radikal bebas.



Tanpa disadari, dalam tubuh kita terbentuk radikal bebas secara terus menerus, baik melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi, dan akibat respons terhadap UV, asap rokok, dan lain-lain. Dengan meningkatnya usia seseorang, pembentukan radikal bebas juga makin meningkat. Secara endogenous, hal ini berkaitan dengan dengan laju metabolisme seiring bertambahnya usia. Secara eksogenous, kemungkinan tubuh terpapar dengan polutan juga semakin tinggi, seiring dengan meningkatnya umur seseorang. Dengan meningkatnya usia seseorang, sel-sel tubuh mengalami degenerasi, proses metabolisme terganggu, dan respons imun juga menurun. Semua faktor ini dapat memicu timbulnya berbagai penyakit degenratif. Oleh sebab itu, tubuh kita memerlukan suatu substansi penting, yakni antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya (1).

Secara umum, antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah proses oksidasi lipid. Dalam arti khusus, antioksidan adalah zat yang dapat menunda atau mencegah terjadinya reaksi antioksidasi radikal bebas dalam oksidasi lipid (15). Menurut Cuppert (1997) dan Disitir Widjaya (2003), antioksidan dinyatakan sebagai senyawa secara nyata dapat memperlambat oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah sekalipun dibandingkan dengan substrat yang dapat dioksidasi (16).

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Akibatnya, kerusakan sel akan dihambat (1).

Berkaitan dengan reaksi oksidasi di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara kontinu dibentuk sendiri oleh tubuh. Bila jumlah senyawa oksigen reaktif (ROS) melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihanannya akan menyerang komponen lipid, protein, maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut stress oksidatif (1).

Antioksidan dalam tubuh bekerja dengan cara:

- a. Mencegah atau menghambat pembentukan radikal bebas baru,
- b. Menginaktivasi atau menangkap radikal dan memotong propagasi (pemutusan rantai),
- c. Memperbaiki (repair) kerusakan oleh radikal.

II.2.1.2 Sumber Radikal Bebas

Terdapat empat sumber utama radikal bebas pada organisme hidup, yaitu pembentukan ATP pada mitokondria menggunakan molekul oksigen. Sejumlah kecil (2-3 % atau kurang) oksigen dalam mitokondria

dapat terkonversi menjadi radikal superoksida yang dapat memicu terbentuknya hidrogen peroksida, radikal hidroksil, dan radikal bebas lainnya (9).

Sumber dari luar tubuh berupa udara terpolusi, asap rokok, garam tembaga dan besi, beberapa bahan fenolik pada makanan herba, dan berbagai obat dapat menjadi sumber radikal bebas (9).

Radikal bebas diproduksi sebagai respon terhadap berbagai aktivitas sehari-hari seperti (9):

1. Makanan (terutama dari hewan seperti ayam dan unggas lainnya, sapi, babi, ikan, belut, telur, produk diet, lemak hewani dan protein, dan produk sisa metabolisme pada jaringan hewan dan organ), makanan hasil sulingan seperti gula putih, tepung terigu, minyak terhidrogenasi, dsb.
2. Pengawet, pewarna, dan bahan tambahan
3. Asap rokok
4. Paparan kelebihan panas dan dingin
5. Alkohol
6. Bakteri
7. Parasit
8. Kemoterapi dan radiasi
9. obat-obatan
10. Radiasi, termasuk radiasi EM dari alat-alat elektronik seperti TV, monitor komputer

11. Penyakit jantung dan stroke
12. Defisiensi nutrisi
13. Paparan sinar matahari
14. Polusi dari air, udara, dan bahan kimia

II.2.1.3 Pembentukan Radikal Bebas

Secara umum, tahapan reaksi pembentukan radikal bebas melalui 3 tahap reaksi, sebagai berikut (1):

1. Tahap inisiasi, yaitu awal pembentukan radikal bebas.

Misalnya:



2. Tahap propagasi, yaitu pemanjangan rantai radikal.

Misalnya:



3. Tahap terminasi, yaitu bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lainnya atau dengan penangkap radikal, sehingga potensi propagasinya rendah.

Misalnya:



II.2.1.4 Klasifikasi Antioksidan (1)

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu antioksidan enzimatik dan non-enzimatik.

- a. Antioksidan enzimatis misalnya enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase.
- b. Antioksidan non-enzimatis masih dibagi lagi menjadi 2 kelompok, yakni:
 1. Antioksidan larut lemak, seperti α -tokoferol, karotenoid, flavonoid, quinon, dan bilirubin
 2. Antioksidan larut air, seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Antioksidan enzimatis dan non-enzimatis tersebut bekerja sama memerangi aktivitas senyawa oksidan di dalam tubuh. Menurut Belleville-Nabet (1996), secara fisiologis terdapat 2 sistem pertahanan tubuh.

- a. Sistem pertahanan preventif, dilakukan oleh kelompok antioksidan sekunder. Pembentukan senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau jika sudah terbentuk, senyawa itu rusak. Pengkelatan metal terjadi dalam cairan ekstrasel, sedangkan perusakan senyawa oksigen reaktif terjadi di dalam sel, terutama oleh sistem enzim,
- b. Sistem pertahanan melalui pemutusan reaksi radikal berantai, dilakukan oleh kelompok antioksidan primer.

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier.

a. Antioksidan Primer

Menurut *McCord* (1979), *Aebi* (1984), dan *Urisini et al.* (1995), antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase (GSH-Px). Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. *Belleville-Nabet* (1996) menyebutkan bahwa antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif.

Sebagai antioksidan, enzim-enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas, dengan cara memutuskan reaksi berantai (polimerisasi), kemudian mengubahnya menjadi produk yang stabil.

Enzim katalase dan glutathion peroksidase bekerja dengan cara mengubah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 , sedangkan SOD bekerja dengan cara mengkatalisis reaksi dismutasi dari radikal anion superoksida menjadi H_2O_2 .

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenous atau non-enzimatis. Antioksidan dalam kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini, terbentuknya senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau dirusak

pembentukannya. Kerja sistem antioksidan non-enzimatis yaitu dengan cara menangkap radikal bebas, kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya. Ketika jumlah radikal bebas berlebihan, kadar antioksidan non-enzimatik yang dapat diamati dalam cairan biologis menurun.

Menurut Soewoto (2001) dan Lampe (1999), antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin, dan albumin.

c. Antioksidan Tersier

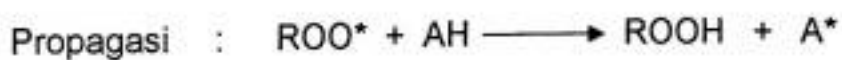
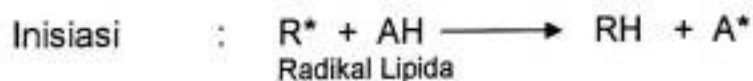
Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas bercirikan oleh rusaknya *single* dan *double strand*, baik gugus non-basa maupun basa (Dempfle & Harrison, 1994; Friedberg, et al., 1995).

II.2.1.5 Mekanisme

Mekanisme kerja antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama tersebut sering disebut sebagai antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida (R^* , ROO^*) atau mengubahnya ke bentuk lebih stabil, sementara turunan radikal antioksidan (A^*) tersebut memiliki keadaan yang lebih stabil dibanding radikal lipida.

Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju autooksidasi dengan berbagai mekanisme diluar mekanisme pemutusan rantai autooksidasi dengan perubahan radikal lipida ke bentuk lebih stabil.

Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lemak dan minyak. penambahan tersebut dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tahap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru (17).



Untuk melindungi sel dan sistem-sistem organ dalam tubuh melawan spesies oksigen reaktif (ROS), manusia harus memiliki kompleks sistem perlindungan antioksidan. Termasuk didalamnya berbagai macam komponen, baik endogen maupun eksogen. Komponen tersebut mencakup:

- a. Antioksidan derivat nutrien, seperti asam askorbat (vit C), tokoferol dan tokotrienol (vit E), karotenoid, dan senyawa lain yang memiliki bobot molekul rendah seperti glutathion dan asam lipoic.

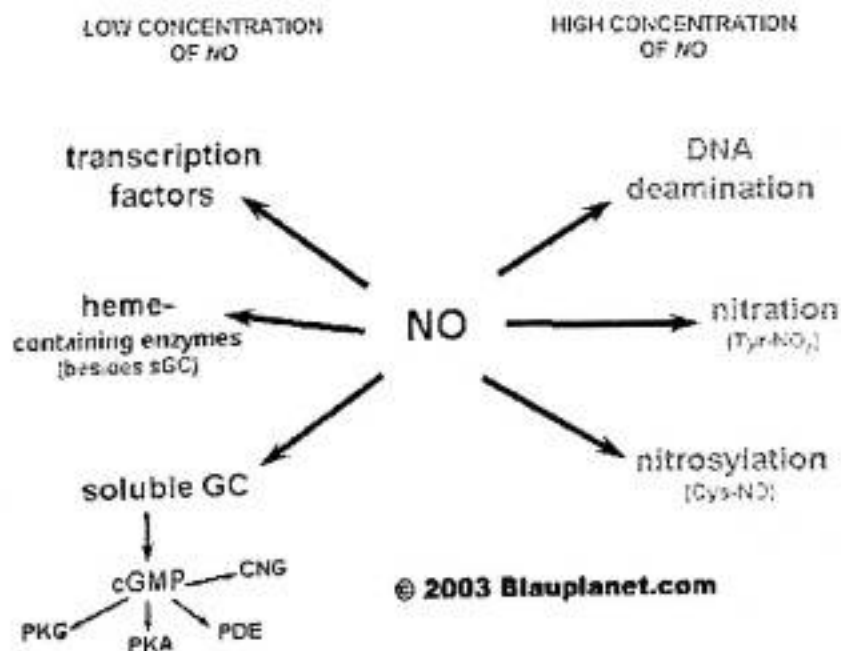
- b. Antioksidan enzim, seperti pueroksid dismutase, glutathion peroksidase, dan glutathion reduktase
- c. Protein pengikat logam, seperti ferritin, loktoferrin, albumin, dan seruloplasmin (14)

II.2.2 Nitrit Oksida

Nitrit oksida (NO^*) adalah suatu mediator kimia penting yang dihasilkan oleh sel-sel endotelial, makrofag, dan neuron. Konsentrasi berlebihan dari nitrit oksida dapat berimplikasi pada efek sitotoksik AIDS, kanker, alzheimer's, dan arthritis (18). Produksi berlebih dari NO^* dapat memediasi efek toksik seperti fragmentasi DNA, kerusakan sel dan kematian sel neuronal (19). NO^* tidak berinteraksi dengan makromolekul bioorganik seperti DNA atau protein secara langsung. Meskipun demikian, dalam kondisi aerobik, molekul NO^* sangat tidak stabil dan bereaksi dengan oksigen untuk memproduksi molekul lain seperti NO_2 , N_2O_4 , N_3O_4 , yang merupakan produk stabil dari nitrat dan nitrit (20) dan peroxynitrite direaksikan dengan superoxide (21).

Nitrit oksida atau RNS terbentuk pada saat bereaksi dengan dengan oksigen atau superoksida, seperti NO_2 , N_2O_4 , N_3O_4 , NO_3^- , dan NO_2 merupakan yang paling reaktif. Senyawa ini bertanggung jawab untuk mengubah struktur dan sifat fungsi dari beberapa komponen sel (22). Radikal nitrit oksida dikatakan juga memainkan peranan penting dalam stress oksidatif pada berbagai macam penyakit selain superoksida, dan hidrogen peroksida (23).

Nitrit oksida memiliki satu elektron tidak berpasangan sehingga disebut radikal bebas. Nitrit oksida adalah radikal reaktif yang berlebih dengan aksi yang sangat penting dalam penanda oksidatif molekul biologis dalam jumlah yang besar dari bermacam-macam proses fisiologis, termasuk neurotransmitter, pengaturan tekanan darah, mekanisme pertahanan, dan pengaturan sistem imun (24).



Gambar 2 . Efek NO



© 2003 Blauplanet.com

Gambar 3 . Beberapa Reaksi dari NO

Nitrit oksida berumur pendek, yaitu hanya beberapa menit dalam lingkungan aqueous. Nitrit oksida sangat stabil dalam lingkungan yang konsentrasi O₂nya rendah. Ketika nitrit oksida larut dalam cairan aqueous dan media lipid, nitrit oksida dapat bereaksi dengan sitoplasma dan membran plasma. Nitrit oksida memiliki efek dalam penghambatan neuron yang lebih bagus dibandingkan sinaps dalam sistem saraf pusat. Sementara itu, nitrit oksida didalam cairan ekstraselular dapat bereaksi dengan oksigen dan air untuk menjadi nitrat dan anion nitrit (24).

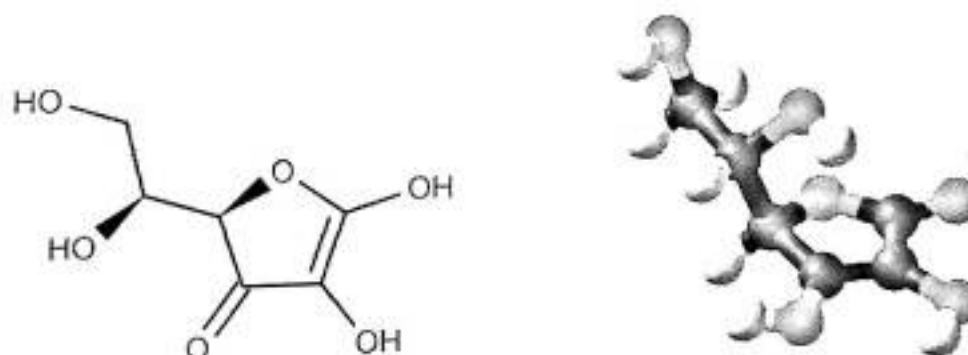
Dalam pembuluh darah, NO^{*} merelaksasi otot polos pada dinding arteriol. Sel-sel endotelial pada pembuluh melepaskan NO^{*}, yang kemudian berdifusi ke dalam otot polos sel menyebabkan relaksasi dan aliran darah yang lebih mudah.

NO^* merupakan vasodilator fisiologis yang disintesis dalam sel endotelial pembuluh. Difusinya mengaktifkan guanyl cyclase, katalisator formasi cGMP.

Pelepasan NO^* pada seluruh bagian glomeruli dari ginjal meningkatkan aliran darah sehingga menambah tingkat filtrasi dan keluaran urin.

Aktivitas lain dari NO^* pada otot polos antara lain; peristaltik pada saluran pencernaan, penghambatan kontraksi pada dinding uterus (25).

II.2.3 Vitamin C



Gambar 4. Struktur vitamin C

Vitamin C murni berupa bahan kristal putih dan tidak berbau dengan rasa asam. Titik lebur antara $190-192^{\circ}\text{C}$, dan stabil selama bertahun-tahun dalam bentuk kristal. Vitamin C tidak larut dalam sebagian besar pelrut organik meskipun larutan 2% dapat dibuat dengan alkohol. Dalam air, vitamin C larut sebanyak 1 gram dalam 3 ml. Sifat pereduksi kuat vitamin C tergantung pada pelepasan atom hidrogen dari gugus

hidroksil pada karbon ikatan rangkap (endiol). Asam askorbat dapat membentuk garam dengan beberapa logam yang membentuk asam dehidroaskorbat. Stabilitas vitamin C dalam larutan asam tergantung pada penurunan kecenderungan hidrolisis asam pada cincin lakton dengan pengurangan pH. Dalam larutan basa, vitamin C terhidrolisis dengan cepat (9).

Asam askorbat bersifat mudah teroksidasi ketika terpapar oksigen, logam, cahaya dan panas, sehingga harus disimpan pada tempat gelap dan dingin, bukan pada wadah logam (9).

Asam askorbat bekerja sebagai antioksidan dengan kemampuannya untuk mengoksidasi. Banyak oksidan seperti radikal hidroksil (dibentuk dari hidrogen peroksida) mengandung elektron tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dan merusak tubuh manusia dan tanaman pada tingkat molekuler. Hal ini terjadi karena reaksinya dengan asam nukleat, protein, dan lipid. Spesies oksigen reaktif mengoksidasi asam askorbat membentuk monohidroaskorbat lalu dehidroaskorbat. Spesies oksigen reaktif direduksi menjadi air, sementara bentuk askorbat teroksidasi menjadi relatif stabil dan tidak reaktif.

Sebagai antioksidan, vitamin C bekerja sebagai donor elektron, dengan cara memindahkan satu elektron ke senyawa logam Cu (Levine, *et al.*, 1995). Selain itu, vitamin C juga dapat menyumbangkan elektron ke dalam reaksi biokimia intraseluler dan ekstraseluler. Vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif (ROS) di dalam sel neutrofil,



monofil, protein dan retina. Vitamin ini juga dapat berinteraksi dengan Fe-ferritin. Di luar sel, vitamin C mampu menghilangkan senyawa oksigen reaktif, mencegah terjadinya LDL teroksidasi, mentransfer elektron ke dalam tokoferol teroksidasi, dan mengabsorpsi logam dalam saluran pencernaan (Levine, *et al.*, 1995) (1).

Vitamin C dapat meningkatkan fungsi imun, dengan menstimulasi produksi interferon (protein yang melindungi sel dari serangan virus). Vitamin ini dapat menstimulasi kemotaksis dan respons proliferasi netrofil, serta melindungi sel dari serangan radikal bebas yang di produksi oleh netrofil teroksidasi. Vitamin C dinyatakan dapat memacu kerja sintesis faktor humoral, terutama antibodi IgG dan IgM (1).

Vitamin C mampu mereduksi radikal superoksida, hidroksil, asam hipoklorida, dan oksigen reaktif yang berasal dari netrofil dan monosit yang teraktivasi. Vitamin ini juga dilaporkan dapat mencegah terjadinya LDL teroksidasi dan memindahkan elektronnya ke tokoferol yang teroksidasi dalam membran sel (1).

Antioksidan vitamin C mampu bereaksi dengan radikal bebas, kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil. Senyawa radikal terakhir ini akan segera berubah menjadi askorbat dan dehidroaskorbat.

Vitamin C antara lain terdapat pada lada hijau, brokoli, paprika, kubis, tomat, kentang, jeruk, lemon, dan buah lainnya (9).

II.3 Uji aktivitas antiradikal bebas (33)

II.3.1 Metode DPPH

Metode DPPH untuk skrining antioksidan diperkenalkan oleh Blois (1958). DPPH merupakan molekul radikal bebas yang stabil yang ditandai oleh delokalisasi cadangan elektron di sekeliling molekulnya secara keseluruhan dengan baik sehingga tidak akan membentuk dimer seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya. Prinsipnya berdasarkan reaksi antara antioksidan dengan DPPH radikal melalui donasi proton. Dengan demikian antioksidan yang bekerja dengan menangkap radikal (*radikal scavenger*) dapat dideteksi dengan metode ini. Prinsip penentuan aktivitas antioksidan metode ini berdasarkan pengukuran serapan senyawa hasil reaksi antara DPPH dengan senyawa antioksidan. Antioksidan akan mendonorkan protonnya kepada DPPH radikal yang berwarna ungu dan akan menghasilkan senyawa yang tidak berwarna. Besarnya aktivitas dinyatakan dengan nilai IC₅₀ yang merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal DPPH.

II.3.2 Metode Linoleat-Tiosianat

Dalam metode ini digunakan asam linoleat sebagai sumber radikal yang merupakan asam lemak tidak jenuh. Radikal ini akan mengoksidasi ion ferro (dari feroklorida) menjadi ion feri, dengan adanya ion tiosianat akan menghasilkan kompleks feri-tiosianat yang berwarna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm.

II.3.3 Metode Tiosianat

Metode ini menggunakan 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) sebagai inisiator pembentukan radikal. Penguraian senyawa ini terjadi dengan bantuan pemanasan menghasilkan molekul nitrogen dan radikal karbon yang dapat bergabung menghasilkan produk yang stabil atau bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan radikal peroksil, sedangkan lemak yang dioksidasi menghasilkan produk primer peroksida. Dalam metode ini bilangan peroksida dinyatakan sebagai kemampuan senyawa mengoksidasi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , selanjutnya Fe^{3+} yang terbentuk bereaksi dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang memberikan panjang gelombang maksimum 500 nm. Makin lama waktu inkubasi, nilai absorban makin meningkat, yang berarti bahwa asam linoleat dalam sampel telah mengalami oksidasi. Meningkatnya intensitas warna merah menunjukkan meningkatnya bilangan peroksida. Kemampuan aktivitas antioksidan pada metode tiosianat dilihat dari rendahnya nilai absorpsi yang terbentuk dibandingkan konsentrasi. Makin rendah ansorbansi berarti makin sedikit peroksida yang dihasilkan.

II.3.4 Metode DNPH

Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan terhadap radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi antara H_2O_2 dan $Fe(III)$ -EDTA dengan penambahan asam askorbat pH 7.4. Penambahan asam askorbat ini akan mempercepat laju pembentukan radikal hidroksil dengan cara mereduksi besi dan mempertahankan penyediaan $Fe(III)$.

Senyawa karbonil yang dihasilkan diukur dengan metode DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) yang dimodifikasi. Warna yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 390 nm.

II.3.5 Metode Nitrit Oksida

Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan terhadap radikal nitrit oksida (NO^\bullet), yang dihasilkan dari reaksi Na-nitroprusid dengan buffer fosfat pH 7.4. dimana penambahan buffer fosfat ini akan melepaskan radikal NO^\bullet dari Na-nitroprusid yang diinkubasi pada suhu 25°C selama 30 menit, kemudian ditambahkan dengan pereaksi Griess yang mengandung sulfanilamid, asam fosfat dan N-naftiletilendiamin, dimana pengukuran absorbannya dapat dilakukan terhadap kromofor yang terbentuk dari reaksi antara NO^\bullet dengan sulfanilamid yang dikopling dengan N-naftiletilendiamin pada panjang gelombang 540-550 nm.

II.4 Metode Ekstraksi Bahan Alam

II.4.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung (26).

II.4.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan dan termasuk biota laut. Zat-zat aktif tersebut berada di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya.

Umumnya zat aktif yang terkandung dalam tanaman maupun hewan lebih larut dalam pelarut organik. Proses terekstraksinya zat aktif dalam tanaman adalah pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan terlarut sehingga terjadi perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan pelarut organik di luar sel. Maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel, dan proses ini berulang di dalam sel dan diluar sel (26,27).

II.4.3 Jenis-Jenis Ekstraksi

Proses ekstraksi dapat dilakukan secara panas dan secara kering. Ekstraksi secara panas yaitu dengan metode refluks dan destilasi uap air, sedangkan ekstraksi dingin yaitu dengan maserasi, perkolasi dan soxhletasi (28).

II.5 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmitans dan absorbans suatu contoh sebagai fungsi panjang gelombang.

II.5.1 Prinsip

Apabila radiasi elektromagnetik pada daerah ultraviolet dan sinar tampak melalui senyawa memiliki 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 (9).

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

$$\log I_0/I = A = a \cdot b \cdot C$$

Dimana; I_0 = intensitas sinar sebelum melewati contoh

I = intensitas sinar setelah melewati contoh

A = absorban

a = absorpsivitas molekul

b = ketebalan kuvet

C = konsentrasi larutan

Oleh karena a dan b nilainya tetap, maka A berbanding lurus dengan C . Dalam penurunan hukum ini dianggap bahwa: (1) radiasi yang masuk adalah monokromatik, (2) spesies penyerap berkelakuan tidak tergantung satu sama lain dalam prose penyerapan, (3) penyerapan terjadi dalam volume yang mempunyai luas penampang yang sama, (4)

dengan radiasi tenaga adalah cepat, dan (5) indeks bias tak tergantung pada konsentrasi (tidak berlaku pada konsentrasi yang tinggi) (9).

II.5.2 Absorpsi oleh senyawa

Serapan cahaya oleh molekul dalam daerah spektrum ultraviolet dan terlihat tergantung pada struktur elektronik dari molekul. Spektra UV dan Visibel dari senyawa-senyawa organik berkaitan erat transisi-transisi diantara tingkatan-tingkatan tenaga elektronik. Oleh karena itu, serapan radiasi uv/visibel sering dikenal sebagai spektroskopi elektronik. Transisi-transisi biasanya antara orbital non ikatan tak jenuh atau orbital anti ikatan. Panjang gelombang serapan merupakan ukuran dari pemisahan tingkatan-tingkatan tenaga dari orbital-orbital yang bersangkutan (32).

II.5.3 Peralatan Spektrofotometer

Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi:

1. Sumber Tenaga

Sumber radiasi yang ideal untuk pengukuran serapan harus menghasilkan spektrum kontinyu 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 tidak seestabil 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 reaksi polikromatik menjadi jalur-jalur yang efektif atau panjang gelombang tunggal.

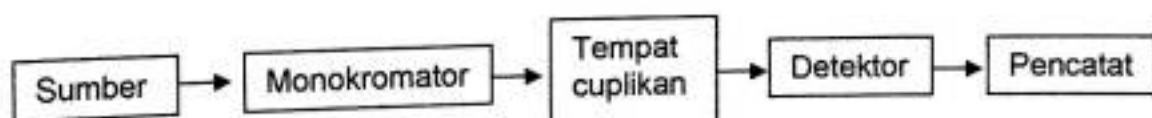
3. Tempat cuplikan

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 sitrat 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. Persyaratan-persyaratan penting untuk detektor meliputi: (1) sensitivitas tinggi hingga dapat mendeteksi tenaga cahaya yang mempunyai tingkatan rendah sekalipun, (2) waktu respon yang pendek, (3) stabilitas yang panjang/lama untuk menjamin respon secara kuantitatif, dan (4) sinyal elektronik yang mudah diperjelas (9).



Gambar 5. Diagram sederhana Spektrofotometer

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

III.1 Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan ialah gelas ukur (Pyrex®), gelas piala (Pyrex®), labu tentukur 10 ml (Iwaki®), mikropipet (), magnetic stirer, sentrifuge, spektrofotometer UV-VIS, timbangan analitik, timbangan kasar (O'Hauss®).

Bahan-bahan yang digunakan adalah aluminium foil, air suling, etanol absolute (E merck®), aseton (E merck®), kain kasa, kertas saring, Na-nitroprusid, sulfanilamide, asam fosfat, etanol, N-naftiletildiamin, buffer fosfat pH 7.4, asam askorbat, dan sampel ongkea.

III.2 Pengambilan Sampel

Sampel diperoleh dari kabupaten Buton, Sulawesi Tenggara.

III.3 Pengolahan Sampel

Sampel berupa klika Ongkea disortasi terlebih dahulu kemudian dikeringkan, selanjutnya sampel diserbukkan.

III.4 Ekstraksi dan Partisi

Sebanyak 1500 gram sampel yang telah diserbukkan dimasukkan kedalam wadah maserasi lalu ditambahkan etanol 70% hingga seluruh sampel terendam. Wadah lalu ditutup rapat dan dibiarkan selama 1 hari sambil dilakukan pengadukan beberapa kali. Campuran kemudian

disaring dan ampasnya ditambah lagi dengan pelarut etanol 70 %. Proses penyarian selanjutnya dilakukan sebanyak 4 kali. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan pelarutnya diuapkan hingga diperoleh ekstrak etanol kering. Selanjutnya sebanyak 2 gram ekstrak etanol kering dipartisi padat cair dengan aseton hingga didapatkan ekstrak larut aseton dan ekstrak tidak larut aseton.

III.5 Prosedur Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas Nitrit Oksida

1. Penyiapan Larutan stok sampel

Dibuat larutan stok sampel 10mg/ml dalam etanol, selanjutnya dibuat konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm.

2. Penyiapan larutan stok standar asam askorbat

Dibuat larutan stok asam askorbat 1.000 µg/ml dalam air suling, selanjutnya dibuat konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm

3. Pembuatan buffer fosfat pH 7.4 (29)

a. Natrium dihidrogen fosfat anhidrat 9.465 g dilarutkan dalam air hingga 1000 ml,

b. Kalium dihidrogen fosfat 9.073 g dilarutkan dalam air hingga 1000 ml.

Dicampur 80 ml larutan (a) dengan 20 ml larutan (b) sehingga didapatkan larutan buffer fosfat pH 7.4

4. Pembuatan Reagen Griess (30)

Reagen Griess dibuat dengan cara mencampur 1 g sulfanilamide, 2 g asam fosfat dan 0.1 g *N*-Naftiletilediamin dalam 100 ml air suling.

5. Pembuatan Na-nitroprusid 5 mM

Na-nitroprusid 150 mg dilarutkan dalam larutan buffer fosfat pH 7.4 dan dicukupkan volumenya hingga 100 ml

6. Pelaksanaan uji aktivitas

Sebanyak 1 ml sampel uji ditambahkan dengan 0.5 ml Na-nitroprusid 5 mM, dibiarkan selama 5 jam pada suhu 25° C. Ditambahkan 0.5 ml reagen Griess. Kromofor yang terbentuk dari reaksi antara nitrit dengan sulfanilamide dikopling dengan *N*-naftiletilediamin dan diukur panjang gelombang 546 nm setelah campuran dibiarkan selama 10 menit (31,29).

Besarnya daya antiradikal bebas untuk setiap sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Daya antiradikal bebas} = \frac{(A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}})}{A_{\text{blanko}}} \times 100 \%$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan analisis probit dari data log konsentrasi dengan probit persentase pengikatan radikal bebas.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Perhitungan IC_{50} pengikatan radikal bebas Nitrit Oksida oleh ekstrak tidak larut aseton dan ekstrak etanol klika Ongkea (*Mezzetia Parviflora* Becc.) serta vitamin C adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak tidak larut aseton klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) memiliki daya pengikatan radikal bebas NO^* sebesar 229,09 ppm,
2. Ekstrak etanol klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) memiliki daya pengikatan radikal bebas NO^* sebesar 316,23 ppm,
3. Vitamin C memiliki daya pengikatan radikal bebas NO^* sebesar 38,01 ppm.

IV.2 Pembahasan

Pengujian antiradikal bebas pada penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.). Sampel kulit kayu yang telah kering digiling dengan tujuan agar luas permukaan menjadi lebih besar sehingga lebih banyak senyawa yang dapat ditarik keluar sel. Sampel yang telah halus kemudian dimaserasi dengan menggunakan cairan penyari etanol 70%. Etanol 70% dipergunakan sebagai penyari karena dalam sampel mengandung polifenol yang kelarutannya baik dalam etanol dan air. Selain itu etanol 70% lebih selektif, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dan telah disarankan oleh farmakope indonesia, serta murah dan mudah diperoleh. Ekstrak etanol kering lalu dipartisi menggunakan pelarut aseton. Didapatkan ekstrak larut dan tidak larut aseton. Partisi dimaksudkan agar ekstrak benar-benar terbagi antara yang larut dengan pelarut dengan yang tidak larut dengan pelarut. Ekstrak larut aseton tidak dilanjutkan ke uji selanjutnya karena tidak memiliki daya antiradikal bebas yang diinginkan.

Pada uji pengikatan radikal bebas NO^* ini digunakan Na-nitroprusid yang dalam larutan aqueous pada pH fisiologis dapat menghasilkan NO^* secara spontan, yang bereaksi dengan oksigen untuk memproduksi ion-ion nitrit yang dapat diukur dengan menggunakan pereaksi Griess. Pengukuran intensitasnya dapat dilakukan pada panjang gelombang 540-550 nm. Nilai analisis probit ditunjukkan dari hasil persen nilai aktivitas pengikatan radikal bebas NO^* . Aktivitas radikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50}

merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk mengikat 50 % aktivitas radikal bebas.

Vitamin C murni digunakan sebagai pembanding karena yang telah diketahui memiliki daya antioksidan yang tinggi. Hasil pengukuran daya antioksidan vitamin C murni ditunjukkan oleh nilai IC_{50} sebesar 38,01 ppm. Sementara hasil pengukuran serapan dan perhitungan IC_{50} aktivitas pengikatan radikal bebas NO^{\bullet} dari ekstrak tidak larut aseton klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) sebesar 229,09 ppm, ekstrak etanol sebesar 316,23 ppm.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak tidak larut aseton memiliki IC_{50} yang lebih rendah dibanding ekstrak etanol, hal ini menandakan bahwa ekstrak tidak larut aseton memiliki aktivitas pengikatan radikal bebas NO^{\bullet} lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol. Ditinjau dari keterlarutan senyawa di dalam pelarut aseton maka diduga adalah kelompok senyawa polar.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan ekstrak tidak larut aseton klinka Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) mempunyai aktivitas pengikatan radikal bebas NO^{*} meskipun masih lebih lemah bila dibandingkan dengan kontrol positif vitamin C, dengan nilai IC₅₀ dari ekstrak tidak larut aseton, ekstrak etanol serta vitamin C berturut-turut adalah sebesar 229,09 ppm, 316,23 ppm, dan 38,01 ppm.

V. 2 Saran

Perlu dilakukan isolasi terhadap senyawa yang diduga memiliki kemampuan antiradikal yang baik.

DAFTAR PUSTAKA

1. Winarsi, Hery. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas; Potensi dan Aplikasinya Dalam Kesehatan*. Kanisius: Yogyakarta
2. Sofia, Dinna. 2005. *Antioksidan dan Radikal Bebas*. [article on the internet]. 2005 [cited June 10, 2009]. Available from <http://www.chem-is-try.org>
3. Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., dan Scaccini, C., 1998. Antioxidant Activity of Different Phenolics Fractions Separated from an Italian Red Wine. *J. Agric. Food Chem*, 46, 361-367.
4. Hakim, EH, Achmad, SA, Makmur, L, Mujahidin, D, Syah, YM, 2001, Profil Kimia Annonaceae, *Bull Soc. Nat. Prod. Chem*, Vol. 1 No. 1, Januari-Juni 2001
5. Keng, H. 1978. *Order and Families of Malayan Seed Plants*. Singapore University Press. Singapore
6. Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid II. Cetakan ke-1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. Jakarta. 771
7. Moses, M.S.M, Hong, L.T, Prawirohatmodjo, S. 1998. PROSEA (*Plant Resources of South East Asia*) Jilid 3. Timbertree; Lesser Known
8. Cui. B., Chai. H., Santisuk. T., Reutrakul. V., Fransworth. N. R, Pezzuto. J.M. Lunghorn. A. D. 1998. Novel Cytotoxic Acetylated Oligorhamnosida From *Mezzetia parviflora*. *Journal of Natural Product*. 61 (12). Pp 1535-1538
9. Abdul, Rahman. Fraksinasi dan Uji Aktivitas Anti Radikal Bebas Ekstrak Aktif Klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.) Secara In Vitro. *Skripsi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin*. Makassar. 2008. hal. 5-6
10. Anonim. 2009. *Antioxidants and Free radicals*. [cited Nov, 11 2009]. Available from <http://www.rice.edu/~jenky/index.html>
11. Bibhabasu Hazra, Santanu Biswas, Nripendranath Mandal. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2008 <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/8/63/prepub>

12. C. Sánchez, Moreno. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. *Food Science and Technology International*, Vol. 8, No. 3, 121-137 (2002)
13. Muhilal. *Teori Radikal Bebas Dalam Gizi dan Kedokteran*. Majalah Cermin Dunia Kedokteran, 1991. Vol. 73. hal. 10
14. Percival, Mark. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights, Advanced Nutrition Publications, Inc.*, NUT031 1/96, Rev. 10/98
15. Kochar SP, Rossell B. 1990. *Detection Estimation and Evaluation of Antioxidants in Food System*. in: B.J.F. Hudson, Editor. Food Antioxidant. Elsevier Applied Science. London
16. Trilaksana W. *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*. Makalah disajikan dalam Situs Internet Graduate Program S3. Institut Pertanian Bogor. Posted 11 Juni 2003
17. Anonim. 2009. *Antioksidan dan Peranannya Bagi Kesehatan*. [cited 11 Nov 2009]. Available from <http://www.netsains.com>
18. Sainani GS, Manika JS, Sainani RG. Oxidative stress-a key factor in pathogenesis of chronic diseases, *Med Update* (1997) 1:1
19. Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: The free radical, nitric oxide. *Annu. Neurol.* (1992) 32: 297-311
20. L.M.J.J. Marcocci, M.T. Droy-Lefaix, L. Packer, The nitric oxide scavenging property of Ginkgo biloba extract Egb 761, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 201 (1994) 748-755
21. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* (1991) 254: 1001-1003
22. Saha MR, Jahangir R, Vhuiyan MMI, Biva IJ. In Vitro Nitric Oxide Scavenging Activity of Ethanol Leaf Extract of Four Bangladeshi Medical Plants, *S. J. Pharm. Sci.* (2008) 1(1&2): 57-62
23. Kumar S, Kumar D, Manjusha, Saroha K, Singh N, Vashishta B. Antioxidant and Free Radical Scavenging Potential of Citrullus colocynthis (L.) Schrad. Methanolic Fruit Extract., *Acta. Pharm.* (2008) 58: 215-220

24. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
25. Aikio, Outi. 2002. *Pulmonary Nitric Oxide In Preterm and Term Infants With Respiratory Failure.* Department of Pediatrics, University of Oulu
26. Departemen Kesehatan RI. Farmakope Indonesia Edisi III. Jakarta
27. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. Sediaan Galenik. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. 1986
28. Harborne JB. 1984. Metode Fitokimia, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Bandung: Penerbit ITB
29. Govinfajaran, R. Dkk, 2004, Antioksidan Potential of Anongeissus latifolia, *Bio. Pharm. Bull.* 27(8) 1266-1269.
30. Higuchi, Takeya, 1961, *Pharmaceutical Analysis*, Interscience Publishing, United States of America, 158, 160.
31. Shirwaikar, A., dkk, 2006, In Vitro Antioksidan Studies on The Benzyl Tetra Isoquinolin Alkaloid Berberine, *Bio. Pharm. Bull* 29(9) 1906-1910.
32. Roth, JH, Blaschke. *Analisis Farmasi.* Terjemahan oleh Kisman dan Ibrahim S. 1994. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press
33. Nur Amir, Muh. Uji Penghambatan Radikal Bebas Nitrit Oksida (NO) Ekstrak Herba Ciplukan (*Physalis angulata* L.) Secara In Vitro. *Skripsi* Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Makassar. 2009

Tabel 1. Harga probit sesuai persentasenya

PROSENTASE	PROBIT									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,25	3,36	3,45	3,52	3,59	3,66
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,95	4,01	4,05	4,08	4,12
20	4,17	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,61	4,64	4,67	4,69	4,72
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,97
50	5,00	5,03	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
60	5,25	5,28	5,31	5,33	5,36	5,39	5,41	5,44	5,47	5,50
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
90	6,28	6,34	6,41	6,48	6,55	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33
99	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
	7,33	7,37	7,41	7,46	7,51	7,58	7,66	7,75	7,88	8,09

Sumber. (Soekardjo, B, Siswandono. 1995. *Prinsip-prinsip Rancangan Obat*)

Tabel 2. Hasil pengukuran serapan NO[•] yang terikat oleh ekstrak tidak larut aseton klicka Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.)

Konsentrasi (ppm)	Serapan (A) (nm)	Serapan rata-rata ($A_{rata-rata}$)	$A_{blanko} - A_{rata}$	% Pengikatan NO
Blanko	0.46644	0.4706		
	0.47058			
	0.47487			
50	0.45551	0.4566	0.014	2.97
	0.45658			
	0.45798			
100	0.38486	0.3962	0.0744	15.81
	0.39612			
	0.40750			
150	0.33278	0.3367	0.1339	28.45
	0.33688			
	0.34049			
200	0.28154	0.2902	0.1804	38.33
	0.29071			
	0.29834			
250	0.21115	0.2345	0.2361	50.17
	0.23936			
	0.25306			

Tabel 3. Hasil pengukuran serapan NO* yang terikat oleh ekstrak awal (etanol) klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.)

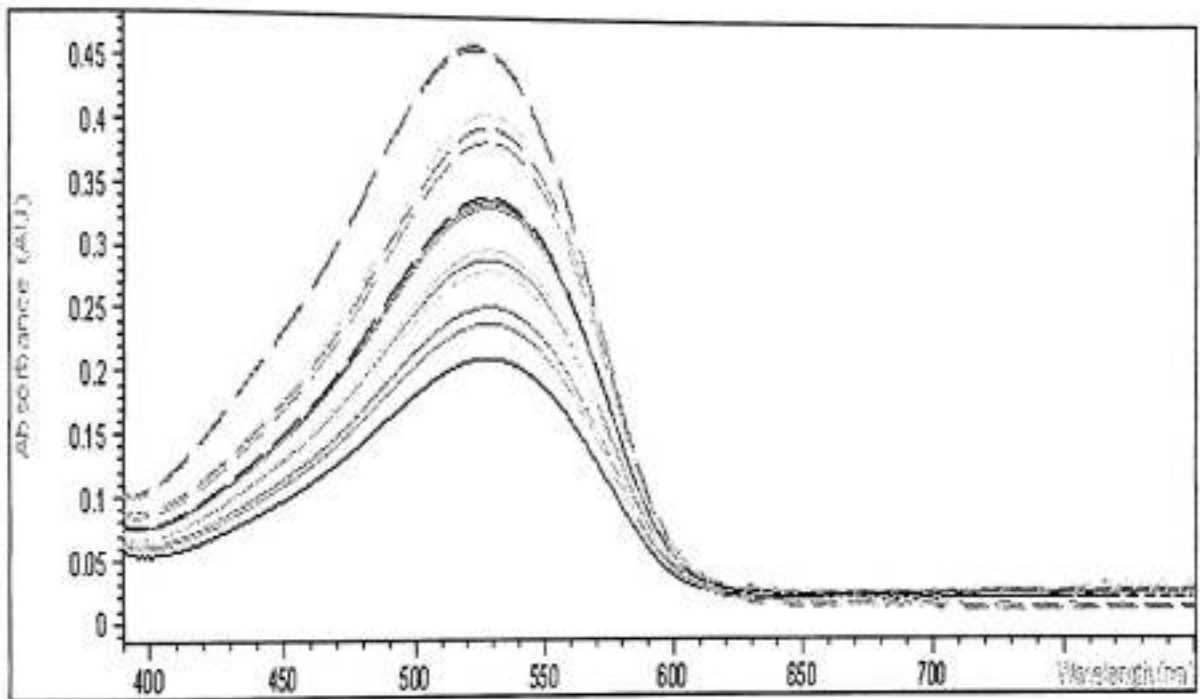
Konsentrasi (ppm)	Serapan (A) (nm)	Serapan rata-rata ($A_{rata-rata}$)	$A_{blanko} - A_{rata}$	% Pengikatan NO
Blanko	0.46644	0.4706		
	0.47058			
	0.47487			
100	0.36182	0.3683	0.1023	21.74
	0.36801			
	0.37504			
200	0.28932	0.2939	0.1767	37.55
	0.30177			
	0.29071			
300	0.24449	0.2507	0.2199	46.73
	0.25063			
	0.25693			
400	0.19763	0.2043	0.2663	56.56
	0.20436			
	0.21076			
500	0.16097	0.1697	0.3009	63.94
	0.17048			
	0.17776			

Tabel 4. Hasil pengukuran serapan NO* yang terikat oleh vitamin C

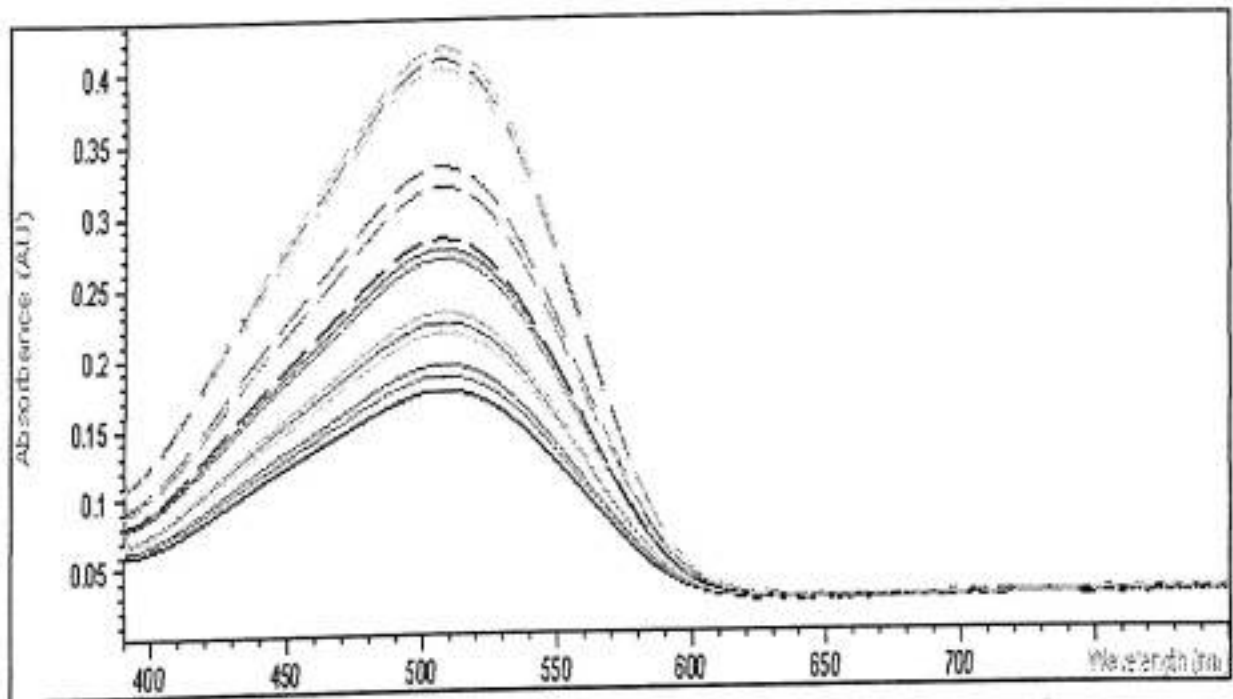
Konsentrasi (ppm)	Serapan (A) (nm)	Serapan rata-rata ($A_{rata-rata}$)	$A_{blanko} - A_{rata}$	% Pengikatan NO
Blanko	0.60436	0.6030		
	0.60454			
	0.60029			
10	0.57421	0.5795	0.0235	3.89
	0.57839			
	0.58600			
20	0.47139	0.4904	0.1126	18.67
	0.50304			
	0.49678			
30	0.39996	0.3920	0.211	34.99
	0.38770			
	0.38862			
40	0.34331	0.3383	0.2647	43.89
	0.33276			
	0.33871			
50	0.29170	0.2860	0.317	52.57
	0.28034			
	0.28598			

Tabel 5. Hasil Perhitungan IC₅₀ ekstrak Klika Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.)

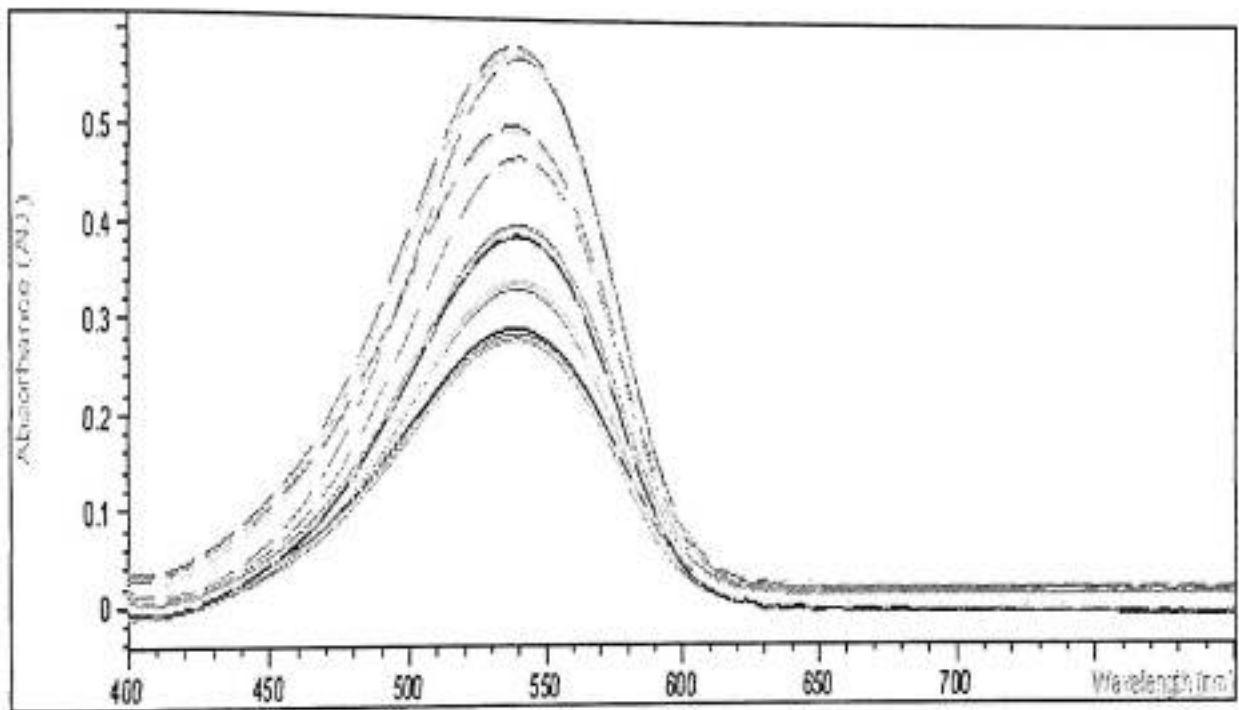
Ekstrak	[] (ppm)	Log [] (x)	% pengikatan NO*	Probit (y)	Persamaan Garis Linear	IC ₅₀ (ppm)
Tidak Larut Aseton	50	1.6989	2.91	3.115	y= - 1.5742+2.7785x r= 0.9977	229.09
	100	2	15.81	3.999		
	150	2.1760	28.45	4.555		
	200	2.3010	38.33	4.789		
	250	2.3079	50.17	5.051		
Etanol	100	2	21.74	4.219	y= 0.9935+1.6038x r= 0.9973	316.2 3
	200	2.3010	37.55	4.681		
	300	2.4771	46.73	4.915		
	400	2.6020	56.56	5.167		
	500	2.6989	63.94	5.358		
Vit C	10	1	3.89	3.236	y= 0.4737+2.8692x r= 0.9894	38.01
	20	1.3010	18.67	4.348		
	30	1.4771	34.99	4.788		
	40	1.6020	43.89	5.087		
	50	1.6989	52.57	5.221		



Gambar 6. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh ekstrak tidak larut aseton



Gambar 7. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh ekstrak etanol

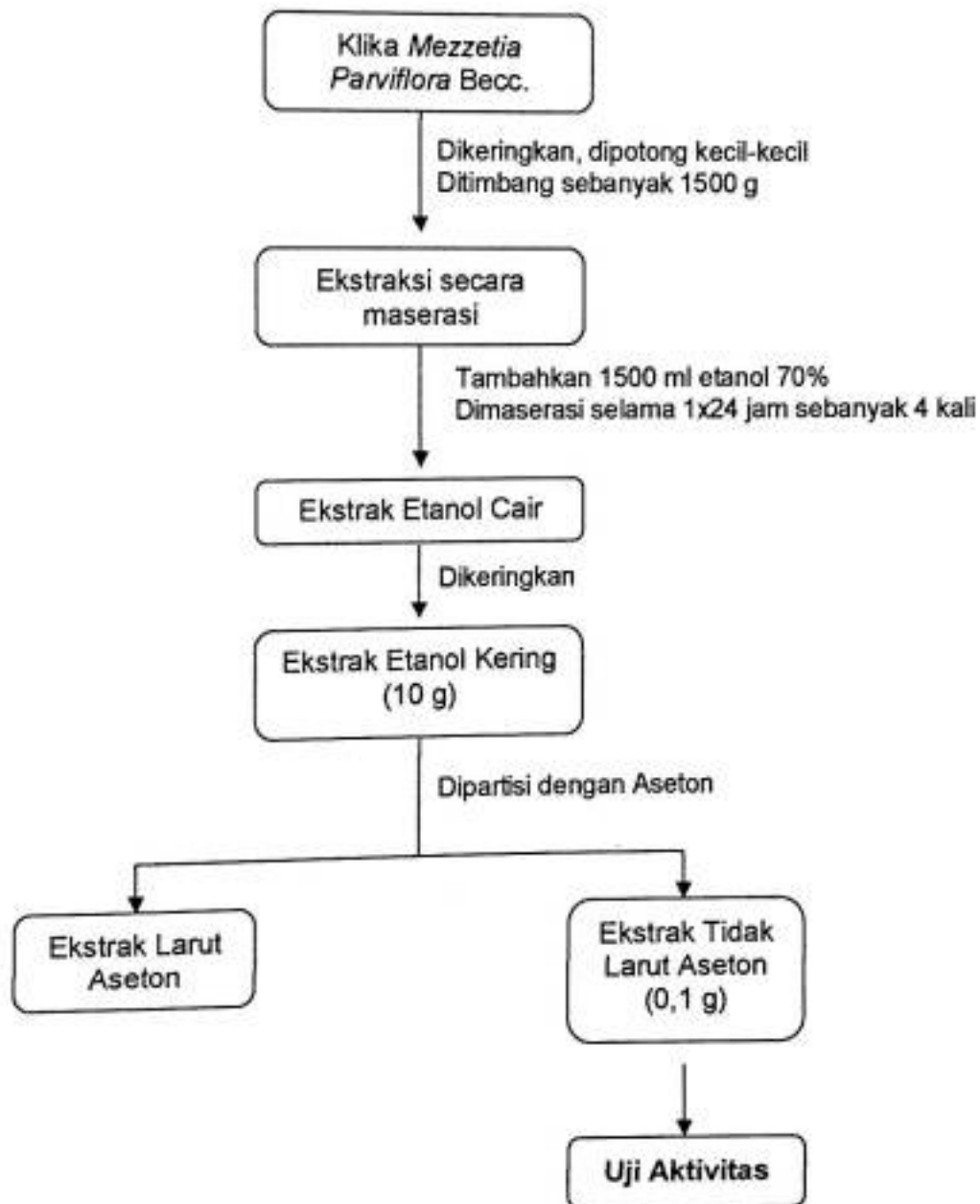


Gambar 8. Kurva serapan pengikatan Nitrit Oksida oleh vitamin C



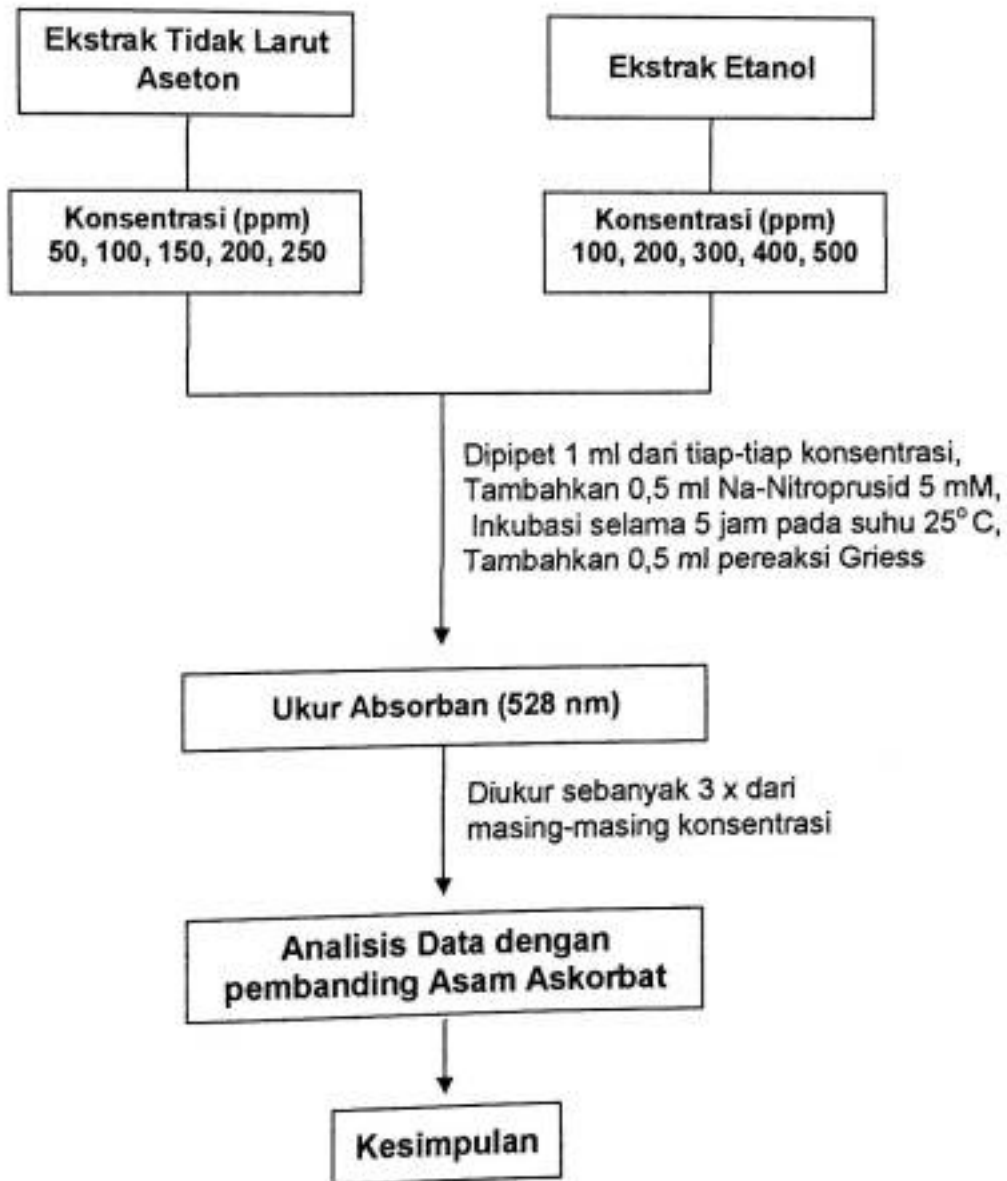
Gambar 9. Ongkea (*Mezzetia parviflora* Becc.)

Lampiran 1. Skema Kerja Ekstraksi dan Partisi





Lampiran 2. Skema Kerja Uji Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas NO[•]



Lampiran 3. Contoh Perhitungan Daya Antiradikal Bebas

$$\text{Daya antiradikal bebas} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100 \%$$

Untuk 50 ppm pada ekstrak tidak larut aseton

$$= \frac{0.4706 - 0.4566}{0.4706} \times 100 \%$$

$$= 2.97\%$$

Lampiran 4. Contoh perhitungan IC₅₀

Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi (x)	Daya antiradikal bebas (%)	Probit (y)
50	1.6989	2.97	3.115
100	2	15.81	3.999
150	2.1760	28.45	4.555
200	2.3010	38.33	4.789
250	2.3079	50.17	5.051

$$y = a + bx$$

$$y = -1.5742 + 2.7785x$$

$$r = 0.9977$$

$$x = \frac{5 + 1.5742}{2.7785}$$

$$x = 2.36$$

$$\text{anti Log (IC}_{50}) = 229.09 \text{ ppm}$$