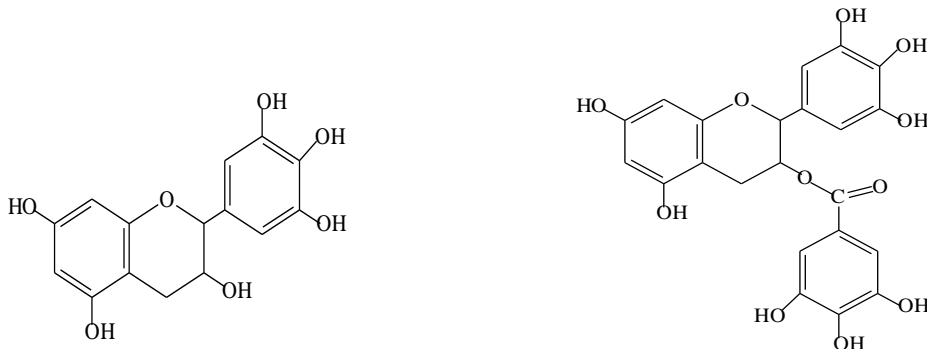
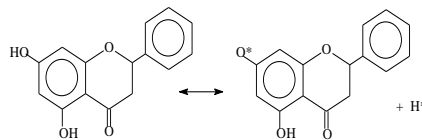
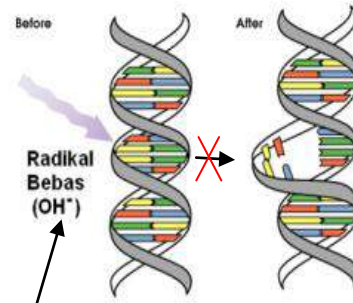
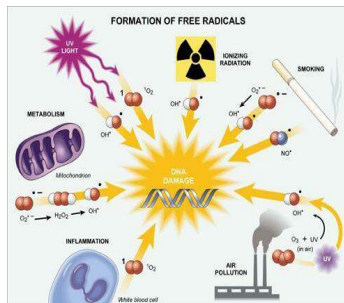


ANTIOKSIDAN



Oleh :
Dr. Drs I Made Oka Adi Parwata, M.Si.



**KIMIA TERAPAN
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS UDAYANA
APRIL 2016**

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa /Ida Sang Hyang Widhi Wasa karena berkat dan rahmat-Nyalah kami bisa menyelesaikan Bahan Ajar “ **Obat Tradisional** “ tepat pada waktu yang kami rencanakan.

Bahan Ajar ini dibuat sebagai salah satu alat bantu mahasiswa kimia yang menempuh mata kuliah Obat Tradisional dalam mempelajari, memahami, menjelaskan dan menghayati tanaman obat tradisional, jenis-jenis Obat Tradisional, aturan perundang-undangan yang mengatur obat tradisional dan standarisasi obat tradisional.

Kami menyadari bahwa Bahan Ajar ini jauh dari kata sempurna maka dari itu kami mohon kritikan dan masukan demi Bahan Ajar ini mendekati kesempurnaannya.

Bahan Ajar ini dapat terselesaikan karena bantuan dari teman-teman sejawat di Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Udayana maka dari itu kami tak lupa mengucapkan banyak-banyak terima kasih dan berkat bantuannya mudah-mudahan ada balasan yang setimpal dari Hyang Maka Kuasa / Ida Sang Hyang Widhi Wasa.

Akhir kata mudah-mudahan Bahan Ajar ini ada manfaatnya bagi para pembaca khususnya mahasiswa kimia yang tertarik akan penelitian dan pengembangan Obat Tradisional agar bisa dipertanggungjawabkan secara ilmiah atau medis.

Bukit Jimbaran, Maret 2016

Penulis.

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
BAB 1 Pendahuluan	1
BAB 2 Radikal Bebas	4
2.1 Radikal Bebas	4
2.2 Efek Radikal Bebas dalam Tubuh	5
2.3 Sumber-sumber Radikal Bebas	9
BAB 3 Antioksidan	13
3.1 Jenis-jenis Antioksidan	13
3.2 Enzim Antioksidan	14
3.2.1 SOD	15
3.2.2 Katalase	17
3.2.3 GPx	18
3.3 Senyawa Antioksidan Alami	19
3.4 Peran metabolit Sekunder dalam mencegah Stres Oksidatif	21
3.5 MDA	28
3.6 8-OHdG	29
3.7 Stress Oksidatif	30
3.8 Kapasitas Antioksidan	36
BAB 4 Metoda Analisis Senyawa Antioksidan	37
4.1 Kapasitas Antioksidan	37
4.1.1 Pengukuran Kapasitas Antioksidan dengan Asam Galat	38
4.1.2 Pengukuran Kapasitas Antioksidana dengan DPPH	38
4.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Endogen	40
4.2.1 Aktivitas SOD	41
4.2.2 Aktivitas Katalase	41
4.2.3 Aktivitas GPx	41
4.2.4 Analisis Kadar 8-OHdG	41
4.2.5 Analisis Kadar MDA	43
4.3. Pemeriksaan SOD dengan Metoda Immunohistokimia	44
4.4 Pemeriksaan Cu,Zn SOD	45
DAFTAR PUSTAKA	46

BAB 1

PENDAHULUAN

Ketidakseimbangan jumlah radikal bebas dengan jumlah antioksidan endogen yang diproduksi tubuh seperti Superoksida dismutase (SOD), Glutation peroksidase (GPx) dan Catalase (CAT) disebut stres oksidatif. Keadaan ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan sel yang dapat menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Radikal bebas dapat berada di dalam tubuh karena adanya hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga atau aktivitas fisik yang berlebihan atau maksimal, peradangan, dan terpapar polusi dari luar tubuh seperti asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, industri dan radiasi matahari.

Reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas ini dapat merusak membran sel normal di sekitarnya dan merusak komposisi DNA sehingga dapat menyebabkan terjadinya suatu mutasi. Mutasi atau kerusakan komposisi suatu DNA dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini dan lain-lain. Senyawa 8-OHdG merupakan salah satu marker yang menunjukkan terjadinya kerusakan DNA akibat radikal bebas yang berlebih. Hal ini disebabkan karena terjadinya oksidasi pada salah satu basa penyusun DNA yaitu Guanosisin. Guanosisin yang teroksidasi akan menjadi 8-hidroksi-2-deoksi-Guanosisin atau 8-OHdG.

Deoksiganosisin (dG) merupakan salah satu basa penyusun DNA dan bila mengalami reaksi oksidasi akan menjadi 8-hidroksi-2'-deoksiganosisin (8-OHdG). Guanosisin juga dapat mengalami hidroksilasi sebagai respon metabolisme normal ataupun akibat pencemaran lingkungan khususnya logam-logam berat dan zat-zat kimia yang karsinogenik. Peningkatan kadar 8-OHdG berhubungan dengan kelainan patologi atau penyakit mencakup depresi, kanker, diabetes, dan hipertensi.

Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau *reactive oxygen species* (ROS). Radikal-radikal bebas ini merupakan hasil pemecahan homolitik dari ikatan kovalen suatu molekul atau pasangan elektron bebas suatu atom. ROS merupakan bagian dari hasil metabolisme sel normal atau sel yang terpapar zat-zat lain yang menyebabkan terjadinya inflamasi atau peradangan. ROS sebagian besar merupakan hasil dari respon fisiologis (ROS endogen) yaitu hasil metabolisme sel normal dan sebagian kecil merupakan hasil paparan dari

luar tubuh (ROS eksogen) yaitu oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus.

ROS terdiri dari superoksida ($*O_2$), hidroksil ($*OH$), peroksil ($ROO*$), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), oksida nitrit ($NO*$), peroksinitrit ($ONOO*$), asam hipoklorit ($HOCl$), dan hasil oksidasi lemak pada makanan. Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil ($*OH$). Radikal hidrosil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. Keadaan ini kalau dibiarkan terus akan menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen yang dikenal dengan nama **stres oksidatif**.

Stres oksidatif juga terjadi akibat menurunnya jumlah oksigen dan nutrisi, sehingga menimbulkan proses iskemik dan kerusakan mikrovaskular. Keadaan ini disebut dengan *Reperfusion Injury*. Hal ini juga dapat memicu terjadinya kerusakan jaringan karena produksi radikal bebas yang berlebih dari hasil metabolisme lemak dan protein yang tersimpan di dalam tubuh karena kurangnya asupan antioksidan dari luar tubuh.

Keadaan di atas menyebabkan tubuh memerlukan suatu asupan yang mengandung suatu senyawa yaitu antioksidan yang mampu menangkap dan menetralkan radikal bebas tersebut sehingga reaksi-reaksi lanjutan yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dapat berhenti dan kerusakan sel dapat dihindari atau induksi suatu penyakit dapat dihentikan. Reaksi terminasi antioksidan biasanya terjadi dengan cara menangkap radikal hidroksil ($*OH$) pada tahap reaksi peroksidasi lemak, protein atau molekul lainnya pada membran sel normal sehingga kerusakan sel dapat dihindari.

Dalam sistem biologis, tubuh biasanya dapat memproduksi sendiri antioksidan yang berupa enzim seperti **superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase** (antioksidan endogen). Terjadi stres oksidatif karena produksi ROS berlebih maka antioksidan endogen ini harus mendapat tambahan antioksidan dari luar tubuh (antioksidan eksogen) yang dapat berasal dari asupan makanan dan minuman yang dikonsumsi tiap hari.

Antioksidan mempunyai peranan yang sangat penting bagi kesehatan tubuh manusia karena fungsinya dapat menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal-radikal bebas. Mekanisme hambatan dari antioksidan biasanya terjadi pada saat reaksi-reaksi inisiasi atau propagasi pada reaksi oksidasi lemak atau molekul lainnya di dalam tubuh dengan cara menyerap dan menetralkan radikal bebas atau

mendekomposisi peroksida (Zheng dan Wang, 2009). Netralisir ini dilakukan dengan cara memberikan satu elektronnya sehingga menjadi senyawa yang lebih stabil atau terjadi reaksi terminasi dan reaksi–reaksi radikal berakhir atau stres oksidatif tidak terjadi pada sel. Disamping mencegah atau menghambat terjadinya stres oksidatif dan kerusakan jaringan sel, antioksidan (Vitamin E) berperan penting dalam menghambat peningkatan produksi sitokin seperti interleukin-6 (Il-6) atau *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) yang merupakan sitokin proinflamasi atau peradangan.

Antioksidan dalam makanan atau minuman dapat berupa antioksidan alami seperti yang terkandung dalam sayur-sayuran, buah-buahan dan minuman maupun antioksidan sintetis yang sengaja ditambahkan (zat aditif) pada makanan dan minuman yang dikonsumsi. Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), Propil Galat (PG) dan Tert-Butil Hidrosi Quinon (TBHQ) adalah senyawa antioksidan sintetis yang secara luas dipergunakan dalam makanan dan minuman. Hasil penelitian Amarowicz (2000) menyatakan bahwa penggunaan atau pemaparan antioksidan sintetis dalam waktu yang cukup lama bukan merupakan antioksidan yang baik karena dapat menimbulkan efek samping berupa peradangan sampai kerusakan hati dan meningkatkan risiko penyakit karsinogenesis pada hewan coba .

Peningkatan konsumsi antioksidan alami yang terdapat dalam buah, sayur, bunga, dan bagian-bagaian lain dari tumbuhan dapat menghindari penyakit-penyakit degeneratif. Kandungan mikronutrien pada buah, sayur-sayuran dan tanaman lain seperti vitamin A, C, E, asam folat, antosianin, senyawa fenol dan flavonoid dapat dijadikan pengganti konsumsi antioksidan sintetis. Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang dilakukan oleh kandungan senyawa fenol, karotenoid dan vitamin C pada buah *Nectarine, Peach dan Plum Cultivars* dapat dipergunakan sebagai antioksidan alami.

Indonesia sangat kaya akan tanam-tanaman yang mengandung senyawa antioksidan dan sudah terbiasa dikonsumsi secara turun temurun baik itu berupa sayur-sayuran maupun buah-buahan. Kandungan fenol dan flavonoid pada ekstrak buah mengkudu mempunyai aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga dapat dipergunakan sebagai antioksidan alami. Buah jambu mente mempunyai aktivitas sebagai antioksidan alami. Senyawa xanton buah manggis dapat dipergunakan sebagai antioksidan karena dapat menurunkan MDA tikus yang terpapar benzopiren.

Ubi jalar ungu dapat dipergunakan sebagai antioksidan alami karena dapat menurunkan kadar MDA dalam darah dan hati mencit setelah diberikan aktivitas fisik maksimal.

Pemberian jus delima merah dapat meningkatkan kadar GPx pada darah mencit dengan aktivitas fisik maksimal. α -tokoferol dapat meningkatkan SOD dan menurunkan MDA jaringan hati tikus di bawah kondisi stres.

Penurunan kadar MDA dan 8-OHdG serta kenaikan antioksidan enzimatik seperti SOD, GPx dan katalase disebabkan oleh kandungan senyawa - senyawa turunan fenol, flavonoid, karotenoid, tokoferol dan Vitamin C. Turunan senyawa fenol seperti misalnya flavonoid dapat menangkap ROS, menghambat kerja enzim yang menghasilkan ROS dan membentuk kelat dengan logam-logam yang memacu terbentuknya ROS sehingga reaksi-reaksi ROS dengan sel-sel normal seperti peroksidasi lemak dan kerusakan DNA dapat dicegah atau stres oksidatif tidak terjadi lagi.

Kandungan senyawa - senyawa turunan fenol, flavonoid, karotenoid, tokoferol dan Vitamin C biasanya banyak terdapat pada daun, buah, bunga dan umbi (rimpang) seperti kandungan flavonoid pada buah mengkudu, isoflavon pada kedelai, flavonoid pada bunga kamboja jenis cendana, antosianin pada daun, umbi ubijalar ungu dan flavonoid pada daun gaharu.

BAB 2

RADIKAL BEBAS

2.1 Radikal bebas

Radikal bebas adalah molekul, atom atau gugus yang memiliki 1 atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif dan radikal seperti misalnya radikal bebas turunan oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Species*). Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS).

Radikal-radikal bebas ini merupakan hasil pemecahan homolitik dari ikatan kovalen suatu molekul atau pasangan elektron bebas suatu atom. *Reactive Oxygen Species* sebagian besar merupakan hasil metabolisme sel normal di dalam tubuh (ROS Endogen) dan sebagian kecil merupakan paparan dari zat-zat lain atau radikal-radikal dari luar tubuh (ROS eksogen)) yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi atau peradangan. ROS endogen merupakan respon fisiologis dari hasil metabolisme sel-sel normal tubuh seperti misalnya metabolisme karbohidrat dan protein. Paparan dari luar tubuh merupakan oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus.

Reactive Oxygen terdiri dari superoksida ($*O_2$), hidroksil ($*OH$), peroksil ($ROO*$), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), oksida nitrit ($NO*$), peroksinitrit ($ONOO*$) dan asam hipoklorit ($HOCl$). Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil ($*OH$). Radikal hidrosil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan.

2.2 Efek Radikal Bebas dalam tubuh

Radikal bebas di dalam tubuh merupakan hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga yang berlebihan, peradangan, dan terpapar polusi (asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat, dan radiasi matahari). Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sel di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron sehingga menjadi lebih stabil, tetapi molekul sel tubuh yang diambil elektronnya akan berubah menjadi radikal bebas. Reaksi ini akan berlangsung

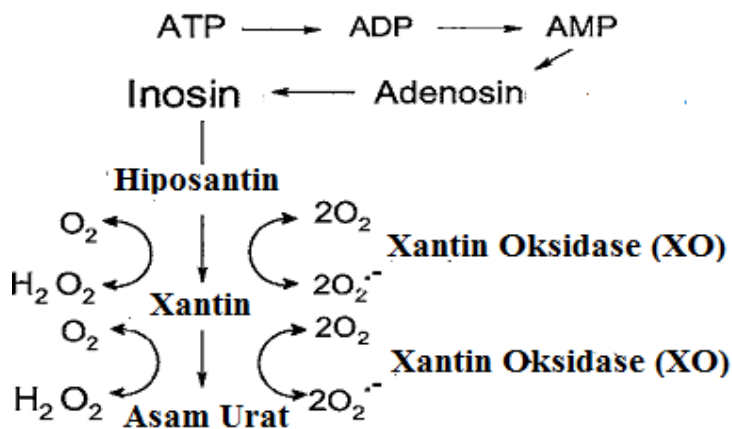
terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan stress oksidatif yang menyebabkan suatu peradangan, kerusakan DNA atau sel dan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya seperti yang ditunjukkan dalam gambar berikut ini :



Gambar 2.1
Pengaruh ROS dan RNS terhadap kesehatan manusia
(Akhlaghi, 2009)

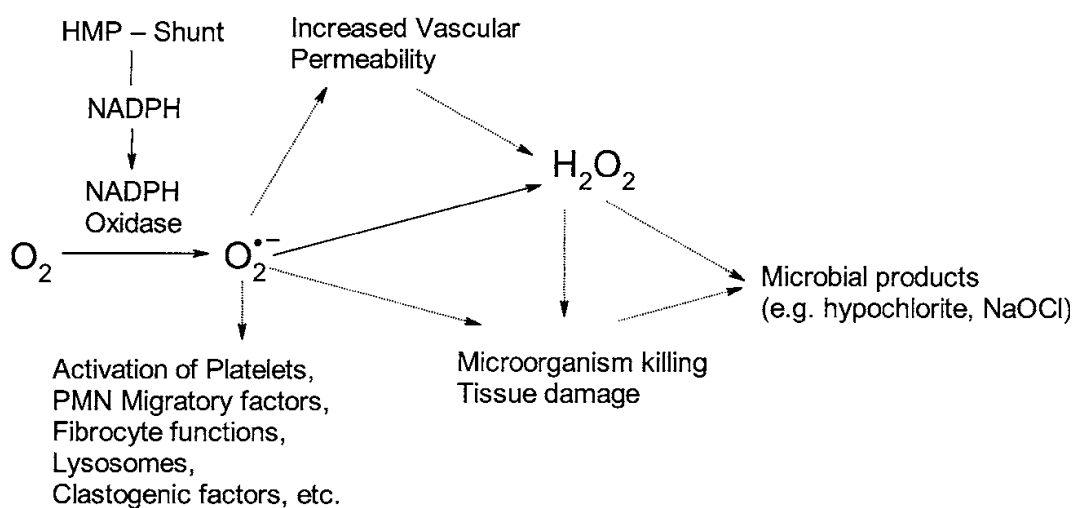
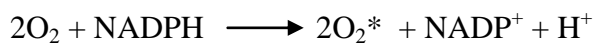
Radikal bebas dapat dihasilkan pada proses terbentuknya asam urat yang dikatalisis oleh enzim xantin oxidase. Dalam proses ini akan dihasilkan radikal superoksida ($*O_2$). Proses metabolisme ini biasanya terjadi pada mitokondria, seperti yang ditunjukkan dalam gambar berikut ini :

JALUR DEGRADASI DARI PURIN



Gambar 2.2
Mekanisme Degradasi purin
(Valko, 2004)

Radikal bebas juga dapat dihasilkan pada proses inflamasi yaitu pada proses perubahan NADPH menjadi NADP dengan katalis NADPH oksidase. Dalam proses ini terjadi kebocoran O_2 yang selanjutnya berubah menjadi radikal superoksida ($^{\cdot}O_2$) yang dapat merangsang terbentuknya sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-6. Proses metabolisme ini biasanya terjadi pada sitoplasma Adapun reaksi kebocoran tersebut dapat terlihat dalam reaksi dan gambar berikut ini :



Gambar 2.3
Peran ROS dalam proses Inflamasi
(Valko, 2004)

Akibat begitu besarnya pengaruh radikal bebas terhadap kesehatan manusia makatubuh memerlukan suatu asupan yang mengandung suatu senyawa yaitu antioksidan yang mampu menangkap dan menetralsir radikal bebas tersebut sehingga reaksi–reaksi lanjutan yang menyebabkan terjadinya stres oksidatif dapat berhenti dan kerusakan sel dapat dihindari atau induksi suatu penyakit dapat dihentikan (Kikuzaki, dkk., 2002 ; Sibuea, 2003).

Reaksi terminasi antioksidan biasanya menangkap radikal hidroksil (*OH) pada tahap reaksi peroksidasi lemak, protein atau molekul lainnya pada membran sel normal sehingga kerusakan sel dapat dihindari (Sadikin, 2002 ; Murray, 2003).

Keberadaan radikal bebas tidak selamanya merugikan tubuh manusia akan tetapi ada juga yang mempunyai efek yang menguntungkan, seperti membantu destruksi sel-sel mikroorganisme, kanker dan proses pematangan sel-sel di dalam tubuh. Leukosit memproduksi radikal bebas untuk memusnahkan gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar dengan cara merusak DNA, mengganggu produksi prostaglandin dan merangsang pembentukan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- α . Akan tetapi produksi radikal bebas yang berlebihan dan produksi antioksidan yang tidak memadai dapat menyebabkan kerusakan sel-sel jaringan dan enzim-enzim. Kerusakan jaringan dapat terjadi akibat gangguan oksidatif yang disebabkan radikal bebas asam lemak atau dikenal sebagai peroksidasi lipid (Murray, 2009 ; Zheng dan Wang, 2009).

Reaksi – reaksi radikal di dalam tubuh merupakan penyebab atau mendasari berbagai keadaan patologis suatu penyakit. Diantara senyawa-senyawa ROS, radikal hidroksil (*OH) merupakan radikal bebas yang paling reaktif atau berbahaya karena mempunyai tingkat reaktivitas sangat tinggi. Radikal hidroksil (*OH) dapat merusak tiga jenis senyawa yang penting untuk mempertahankan ketahanan sel yaitu :

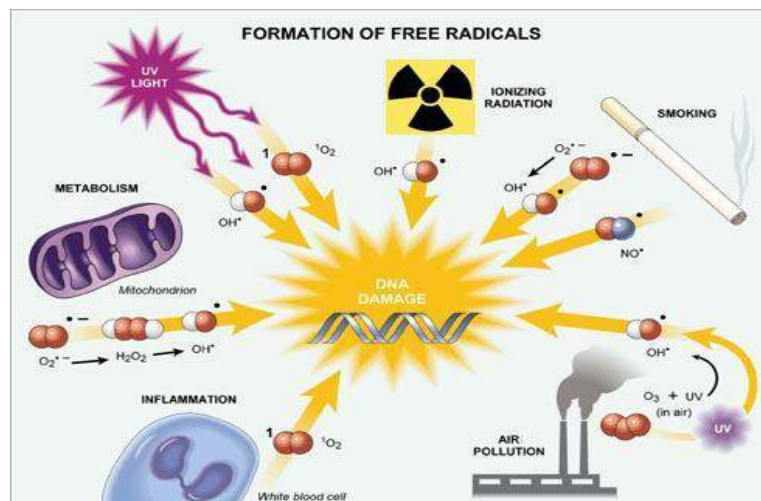
1. Asam lemak tak jenuh jamak (PUFA) yang merupakan komponen penting fosfolipid penyusun membran sel.
2. DNA, yang merupakan piranti genetik dari sel.
3. Protein, yang memegang berbagai peran penting seperti enzim, reseptor, antibodi, dan pembentuk matriks serta sitoskeleton (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Sadikin, 2002 ; Murray, 2003).

Regulasi jumlah radikal bebas secara normal dalam sistem biologis tubuh dilakukan oleh enzim-enzim antioksidan endogenous seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Pengukuran radikal bebas di dalam tubuh sangat

sulit dilakukan karena radikal bebas bereaksi sangat cepat sehingga seringkali dilakukan pengukuran tidak langsung melalui produk turunannya seperti malondialdehida (MDA) dan 4-hidroksinonenal. Kedua senyawa tersebut sering digunakan untuk pengukuran reaksi radikal bebas lipid (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Sadikin, 2002 ; Murray, 2009).

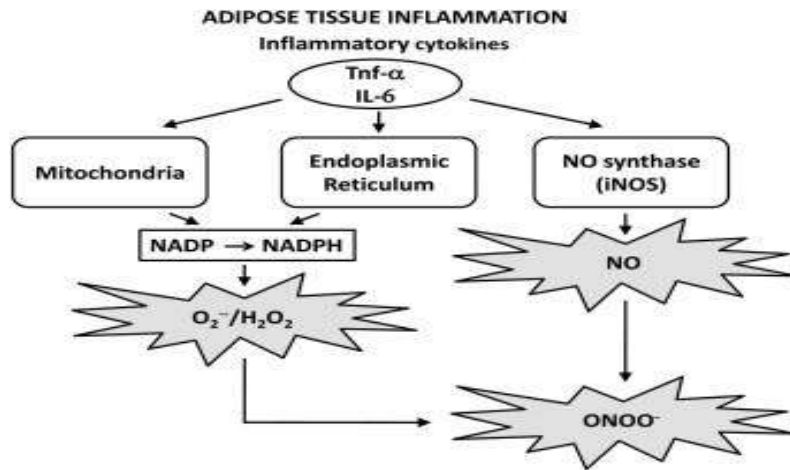
2.3 Sumber-sumber Radikal Bebas

Sumber radikal bebas ada dua yaitu sumber eksogen dan sumber endogen. Sumber eksogen biasanya berasal dari luar tubuh seperti polutan udara, radiasi, zat-zat kimia karsinogenik, asap rokok, bakteri, virus dan efek obat (obat anastesi dan pestisida). Sumber endogen yaitu radikal bebas yang merupakan hasil metabolik normal dalam tubuh manusia seperti proses oksidasi makanan, proses oksidasi xantin dan olah raga yang berlebihan, seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.1 berikut ini : (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Sadikin, 2002 ; Murray, 2009).



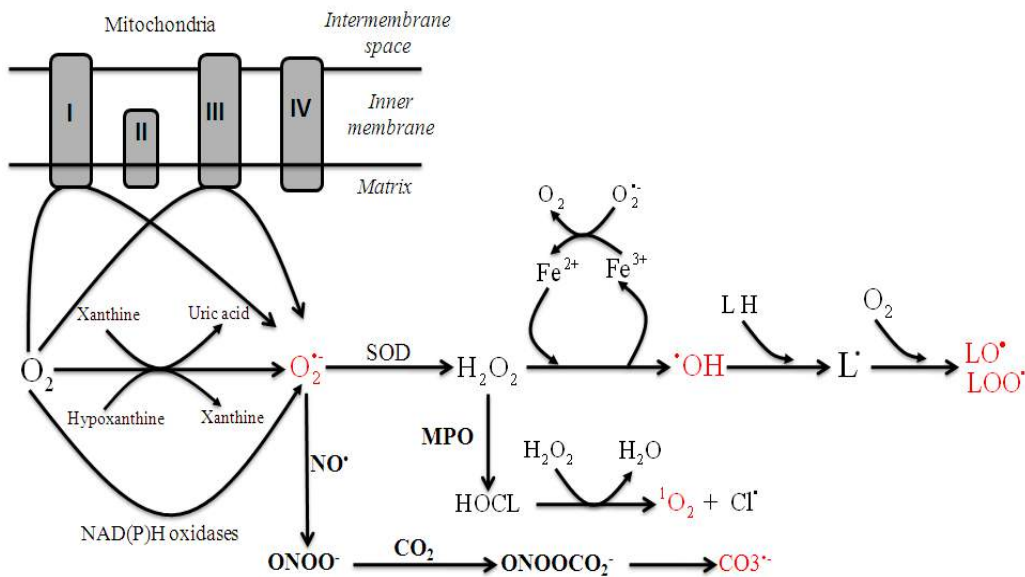
Gambar 2.4
Sumber-sumber Radikal bebas yang meyerang DNA
(Vasudevan, 2004)

Sumber lain dari ROS dan RNS dapat terbentuk dari proses inflamasi seperti yang ditunjukkan dalam berikut ini :



Gambar 2.5
Mekanisme Pembentukan ROS dan RNS pada proses inflamasi
(Franch, 2011)

Pembentukan ROS atau RNS dapat terjadi pada proses metabolisme dimana terjadi kebocoran O₂ yang pada proses selanjutnya menjadi radikal O₂^{*}, radikal ONOO^{*}, *OH dan radikal yang lain. Radikal *OH akan memperoksidasi lemak sehingga menjadi radikal baru LO^{*} atau LOO^{*} seperti yang ditunjukkan dalam gambar berikut ini :

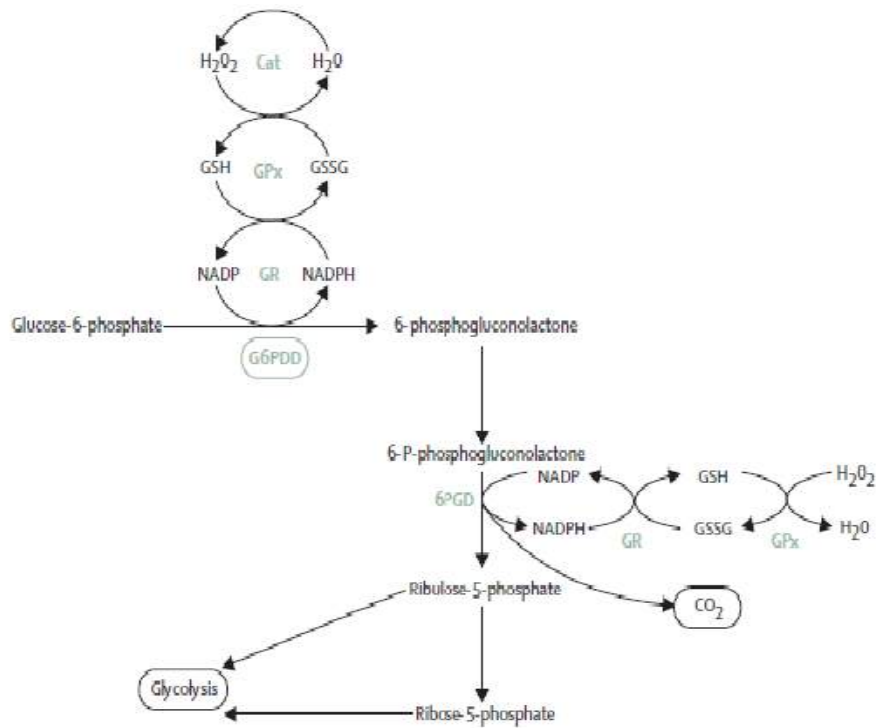


Gambar 2.6
Mekanisme pembentukan ROS/RNS pada proses Metabolisme
(Kunwar, 2011)

Pelatihan fisik memulai respon fisiologis dan biokimia yang kompleks. Setiap gerakan otot yang cepat dimulai dengan metabolisme anaerobik. Tenaganya berasal dari pemecahan ATP dengan hasil ADP atau AMP dan berlangsung di mitokondria. Pelepasan energi disertai dengan meningkatnya aliran elektron dalam rangkaian respirasi mitokondria sehingga pembentukan oksigen reaktif (O_2^-) dan H_2O_2 dan upaya pembentukan ATP.

Pelatihan cenderung mengosongkan ATP dan meningkatkan jumlah ADP yang tentunya akan merangsang ADP katabolisme dan konversi *Xanthine dehydrogenase* menjadi *Xanthine oxidase*. *Xanthine oxidase* inilah akan membentuk radikal bebas (O_2^-). Terbentuknya radikal bebas akan menyebabkan ketidakseimbangan yang disebut sebagai stress oksidatif dengan hasil akhir rusaknya lemak, protein dan DNA.

Terjadinya stres oksidatif akibat paparan radikal eksogen dan aktivitas berlebih dapat menyebabkan terjadinya defisiensi Glukosa-6-fosfat dehidrogenase (G6PD). Defisiensi G6PD akan mempengaruhi metabolisme karbohidrat yang pada akhirnya akan mengganggu kesehatan manusia. Metabolisme glukosa melalui jalur heksosa monofosfat meningkat beberapa kali ketika eritrosit terpapar dengan obat-obatan atau toksin yang membentuk radikal bebas (Cappellini, 2009). G6PD menginisiasi jalur ini dengan menjadi katalis oksidasi glukosa-6-fosfat menjadi 6-phosphogluconolactone oleh ko-enzim nikotinamida adenin-dinucleotidephosphate (NADP), yang dikurangi menjadi NADPH. 6-phosphogluconolactone menghidrolisis secara spontan untuk 6-phosphogluconate. Ini berfungsi sebagai substrat untuk 6-phosphogluconate dehidrogenase dan NADP. Langkah kedua dalam jalur enzimatik ini juga berhubungan dengan pengurangan NADP⁺ untuk NADPH. NADPH dihasilkan sebagai akibat dari reaksi mengurangi glutathion teroksidasi (GSSG) untuk mengurangi glutathion (GSH) dalam reaksi dikatalisis oleh glutathion reduktase. GSH kemudian mengurangi hidrogen peroksida, oksidan kuat yang dihasilkan dalam metabolisme sel dan sebagai konsekuensi dari respon inflamasi, dan oksidan endogen dan eksogen lainnya, pada reaksi katalis oleh glutathione peroksidase seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.16 berikut ini :



Gambar 2.7
 Metabolisme karbohidrat melalui jalur fosfat pentosa
 (Cappellini,2008)

BAB 3 ANTIOKSIDAN

3.1. Jenis-jenis antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, karsinogenesis, dan penyakit lainnya. Senyawa antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Murray, 2009).

Dalam melawan bahaya radikal bebas baik radikal bebas eksogen maupun endogen, tubuh manusia telah mempersiapkan penangkal berupa sistem antioksidan yang terdiri dari 3 golongan yaitu : (Anonim, 2012)

1. Antioksidan Primer yaitu antioksidan yang berfungsi mencegah pembentukan radikal bebas selanjutnya (propagasi), antioksidan tersebut adalah transferin, feritin, albumin.
2. Antioksidan Sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas, antioksidan tersebut adalah Superoxide Dismutase (SOD), Glutathion Peroxidase (GPx) dan katalase.
3. Antioksidan Tersier atau repair enzyme yaitu antioksidan yang berfungsi memperbaiki jaringan tubuh yang rusak oleh radikal bebas, antioksidan tersebut adalah Metionin sulfosida reduktase, Metionin sulfosida reduktase, *DNA repair enzymes*, *protease*, *transferase* dan *lipase*.

Berdasarkan sumbernya antioksidan yang dapat dimanfaatkan oleh manusia dikelompokkan menjadi tiga yaitu :

1. Antioksidan yang sudah diproduksi di dalam tubuh manusia yang dikenal dengan antioksidan endogen atau enzim antioksidan (enzim Superoksida Dismutase (SOD), Glutathion Peroksidase (GPx), dan Katalase (CAT)).
2. Antioksidan sintetis yang banyak digunakan pada produk pangan seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), propil galat dan Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ).

3. Antioksidan alami yang diperoleh dari bagian-bagian tanaman seperti kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari seperti vitamin A, vitamin C, vitamin E dan senyawa fenolik (flavonoid).

Antioksidan sintetis sudah banyak digunakan di masyarakat baik pada minuman maupun makanan kemasan yang dijual di pasaran seperti Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluena (BHT), Propil Galat (PG) dan Tert-Butil Hidrosi Quinon (TBHQ). Menurut hasil penelitian Amarowicz *et al.* (2000) menyatakan bahwa penggunaan bahan sintetis ini dapat meningkatkan risiko penyakit kanker. Studi epidemiologi menunjukkan bahwa adanya peningkatan konsumsi antioksidan alami yang terdapat dalam buah, sayur, bunga dan bagian-bagian lain dari tumbuhan dapat mencegah penyakit-penyakit akibat stress oksidatif seperti kanker, jantung, peradangan ginjal dan hati.

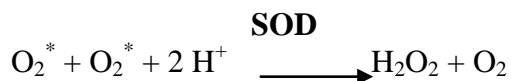
Mikronutrien yang terkandung dalam tumbuhan seperti vitamin A, C, E, asam folat, karotenoid, antosianin, dan polifenol memiliki kemampuan menangkap radikal bebas sehingga dapat dijadikan pengganti konsumsi antioksidan sintetis (Gill, 2002). Hal ini dibuktikan oleh Shafie (2011) bahwa vitamin E yang diberikan pada mencit secara oral dapat mencegah terjadinya penyakit periodontal. Wrasiyati, (2011) menyatakan bahwa ekstrak bunga kamboja cendana dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, GPx dan Katalase. Zheng dan Wang dkk. (2009) menyatakan bahwa lebih dari 40 herbal tanaman obat di Cina mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup tinggi dan dari 40 herbal tersebut mengandung senyawa fenol yang tinggi termasuk diantaranya kandungan flavonoidnya yang tinggi. Hasil penelitian You Gan R., (2010) menyatakan bahwa kandungan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan 40 species tanaman obat di Cina dapat dipergunakan untuk mencegah dan terapi penyakit *cardiovascular* dan *cerebrovascular*. Adanya gugus -OH pada tokoferol (Vit.E) dan senyawa fenol lainnya serta ikatan rangkap ($>C=C<$) pada β -karoten dapat menghambat dan menetralkan reaksi radikal bebas (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Murray, 2009).

3.2 Enzim Antioksidan

Enzim antioksidan atau antioksidan endogenous enzimatis adalah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh manusia sebagai penangkal radikal bebas eksogen maupun radikal bebas endogen seperti : superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT) dan glutathion peroksidase (GPx). Antioksidan enzimatis disebut juga antioksidan sekunder yaitu antioksidan yang berfungsi menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukan radikal bebas (Sadikin, 2002 ; Murray, 2009).

3.2.1 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase adalah metaloenzim yang mengkatalis reaksi reduksi radikal anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). Enzim ini bersifat tidak stabil terhadap panas, cukup stabil pada kondisi basa, dan masih mempunyai aktivitas walaupun disimpan sampai 5 tahun pada suhu $5^\circ C$. Aktivitas SOD tertinggi ditemukan di hati, kelenjar adrenalin, ginjal, darah, limfa, pankreas, otak, paru-paru, lambung, usus, ovarium dan timus (Murray 2009). Adapun reaksinya adalah



Superoxide Dismutase (SOD) merupakan salah satu antioksidan enzimatik dan metaloenzim dalam tubuh karena aktivitasnya tergantung pada kofaktor logam Cu, Fe, Zn dan Mn. Berdasarkan hal ini SOD dikelompokkan menjadi Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD dan ada juga namanya EC-SOD. Cu/Zn-SOD ditemukan dalam sitosol, kloroplas tanaman tingkat tinggi dan kemungkinan juga di ekstraseluler, Mn-SOD ditemukan dalam mitokondria sel eukariot dan peroksisom, Fe-SOD ditemukan berikatan dengan kloroplas, dan EC-SOD pada cairan ekstraseluler mamalia (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009).

Derajat aktivitas masing-masing SOD dipengaruhi oleh derajat stres oksidatif pada kompartemen subseluler. Kerja enzim SOD dapat dilihat pada banyaknya produk peroksidasi lipid dari setiap organel. Tingginya aktivitas SOD akan tergambarkan oleh rendahnya produk oksidasi lipid (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009).

SOD diidentifikasi sebagai eritrocuprein, indofenol oksidase, dan tetrazolium oksidase. Gen SOD terletak pada kromosom 21, 6 & 4, secara berurutan (21q22.1, 6q25.3 & 4p15.3-p15.1) dan berfungsi sebagai katalisator reaksi dismutasi dari anion superoksida (O_2^*) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) & molekul oksigen (O_2) (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009).

Isoenzim EC-SOD merupakan glikoprotein yang terletak dalam matriks jaringan interstisial dan glikokolik pada permukaan sel, berikatan dengan proteoglikan. Hanya ada 1 fraksi kecil EC-SOD yang ditemukan dalam cairan ekstrasel seperti plasma, limpa, cairan sinovial, dan cairan serebrospinal. Isoenzim EC-SOD merupakan homotetramer terglukolisasi, aktif dalam cairan dan matriks ekstraseluler seperti jantung, plasenta dan paru paru, mengendalikan bioavailabilitas nitrit oksida yang diinduksi oleh IFN, namun

keberadaannya dapat dihambat oleh TNF dan TGF (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009).

Secara fisiologis tubuh menghasilkan senyawa radikal bebas melalui proses fosforilasi oksidatif. Selama proses ini , O_2 akan tereduksi menjadi H_2O dengan penambahan 4 elektron, sehingga terbentuk radikal anion superoksida yang kemudian diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) oleh enzim SOD. Proses fosforilasi dalam mitokondria menyebabkan 1 molekul O_2 tereduksi oleh 4 elektron bersama-sama dengan ion H^+ membentuk 2 molekul H_2O . Jika jumlah elektron yang mereduksi O_2 kurang dari 4, proses fosforilasi berlangsung tidak sempurna sehingga akan terbentuk senyawa radikal bebas (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009).

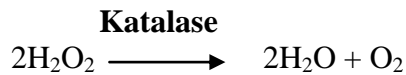
Kelainan Fungsi EC-SOD adalah Aterosklerosis. Aterosklerosis adalah penyebab utama penyakit jantung dan pembuluh darah lainnya yang ditandai ateroma (plak kekuningan) yang mengandung lipid dan kolesterol pada dinding arteri dan terjadi pengerasan dinding arteri serta penyempitan lumen arteri (Mc. Cord, 2006 ; Goodsell, 2007 ; Murray, 2009 ; Grasi, 2010).

Aterosklerosis dapat terjadi melalui proses inflamasi kronik dan stress oksidatif. Pada dinding pembuluh darah arteri terdapat sel endotel yang melepaskan nitric oxide dan mengatur kelenturan pembuluh darah, menjaga komposisi otot tetap seimbang, dan mencegah pembekuan darah sehingga tidak terjadi inflamasi dan stress oksidatif (Grasi, 2010).

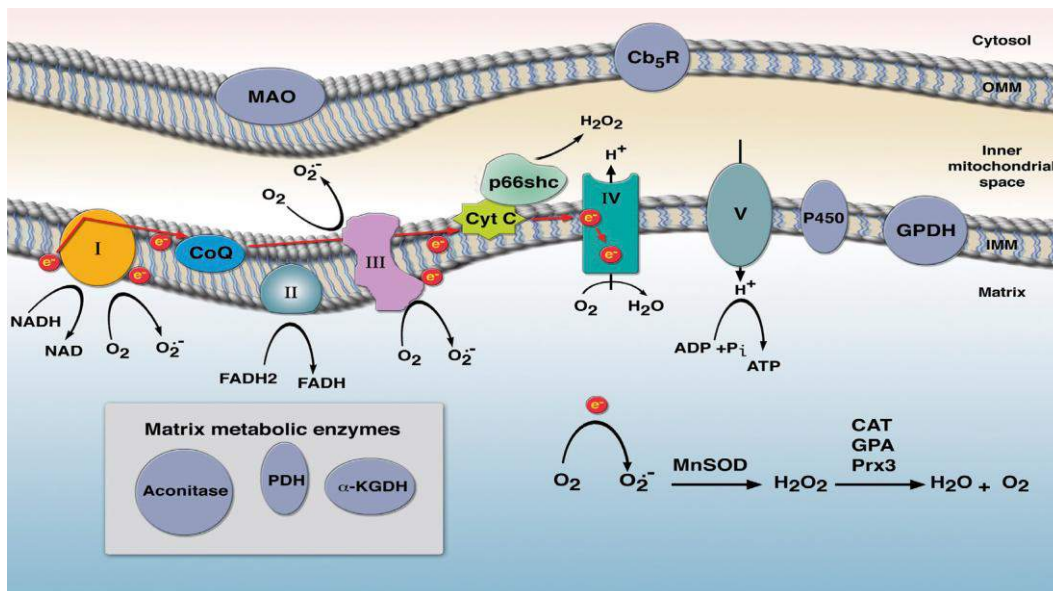
Kelainan fungsi SOD dan peningkatan jumlah radikal bebas yang terjadi pada penderita aterosklerosis adalah terjadinya kerusakan atau disfungsi endotel pada pembuluh darah. Disfungsi endotel pada aterosklerosis terjadi secara bertahap, yaitu pada dekade pertama (awal terjadinya akumulasi lipid di intraseluler), dekade ketiga (terjadi atheroma), dan dekade keempat (terjadinya fibroatheroma dan komplikasi pada sel endotel). Jika sel endotel mengalami kerusakan, maka nitric oxide berkurang, sistim keseimbangan dinding pembuluh darah akan terganggu dan terjadi penebalan otot dinding pembuluh darah sehingga makrofag, trombosit, LDL kolesterol yang teroksidasi akan membentuk suatu kompleks yang disebut fatty streak dan plak aterosklerosis. Proses pembentukan aterosklerosis secara teori inflamasi dan stress oksidatif dapat dicegah, yaitu terapi antioksidan dengan cara pemberian suplemen antioksidan secara oral (Grasi, 2010).

3.2.2 Katalase

Katalase adalah enzim yang disusun oleh lebih dari 500 asam amino dan memiliki gugus forfirin. Enzim ini mengkatalis reaksi reduksi senyawa hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi oksigen (O_2) dan air (H_2O). Aktivitas katalase optimal pada pH 7 dan dapat meningkat dengan meningkatnya akumulasi H_2O_2 . Katalase dengan konsentrasi yang tinggi ditemukan pada hati, darah, ginjal, otak, paru-paru, jaringan adiposa dan kelenjar adrenal. Adapun reaksinya adalah (Murray, 2009)



Mekanisme kerja antioksidan enzimatik di atas dapat dilihat dalam gambar berikut ini :



Gambar 2.8
Mekanisme Kerja Antioksidan enzimatik
(Finkel, 2011)

Dalam gambar di atas terlihat O_2^* (radikal superoksida) yang dihasilkan dalam perubahan NADH menjadi NAD, PADH₂ menjadi PADH dirubah menjadi H_2O_2 oleh MnSOD dan selanjutnya produk H_2O_2 dirubah menjadi H_2O dan O_2 oleh Katalase.

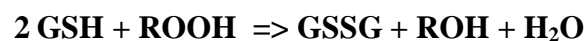
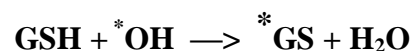
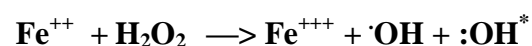
3.2.3 Glutation Peroksidase

Glutation peroksidase adalah selanoprotein yang terdiri atas empat sub unit protein yang mengkatalis reaksi reduksi H_2O_2 menjadi senyawa organik hidroperoksida (ROOH). Glutation banyak ditemukan dalam sitosol hati.

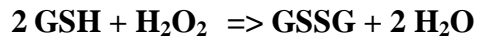
Glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) adalah antioksidan sulfhydryl (-SH), antotoksin dan kofaktor enzim. GSH ada dimana-mana termasuk hewan, tumbuhan, tanaman dan mikroorganisme, larut dalam air dan berada di dalam cytosol dari sel atau substrat larut dalam air lainnya. Dan karena jumlahnya yang cukup besar maka disebutkan sebagai antioksidan dalam sel yang mayor (Kidd P,1997).

Glutathione eksis di dalam sel dalam bentuk antioksidan tereduksi yang dikenal dengan istilah GSH, dan dalam bentuk teroksidasi yang dikenal dengan istilah Glutathione Disulfida (GSSG). Rasio antara GSH/GSSG merupakan indikator sensitif untuk stress oksidasi. GSH dengan enzim glutathione peroksidase (GPx) dapat mengkatalis proses reduksi Hidroperoksida lemak menjadi alkohol dan hidrogen peroksida menjadi air. Pada saat mengkatalis tadi ikatan disulfida dari 2 GSH akan berikatan membentuk Glutathione teroksidasi (GSSG), dan enzim glutathione reduktase dapat mendaur ulang GSSG menjadi GSH kembali dengan cara mengoksidasi NADPH. Ketika sel terekspos dengan stress oksidasi maka akan terjadi penumpukan GSSG dan rasio GSH/GSSG akan menurun (Oxford Biomedical Research, 2008).

Mekanisme kerja dari GSH didalam proses peredaman radikal bebas yaitu dalam segi kemampuannya mereduksi hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) yang berasal dari reaksi Fenton (Best B, 2003).



Disamping itu enzim Glutathione peroxidase menetralkan Hidrogen Peroksida (H_2O_2) dengan cara mengambil hydrogen untuk membentuk 2 H_2O dan satu GSSG, sedangkan enzim glutathione reduktase akan menjadikan GSSG, dengan menggunakan enzim NADPH sebagai sumber hydrogen, menjadi GSH kembali



Dengan kata lain glutathione di sini mencegah hidroksil radikal yang dapat merubah molekul lemak menjadi lemak radikal ($\cdot\text{L}$) atau peroksida lemak ($\text{LOO}\cdot$) melalui dua sisi yaitu mencegah terbentuknya hidroksil radikal ($\cdot\text{OH}$) bereaksi dengan molekul lemak atau mencegah terbentuknya hidroksil radikal dengan merubah Hidrogen Peroksida (H_2O_2) menjadi molekul air.

Meningkatnya peroksidasi lemak dalam dinding pembuluh darah yang mengalami aterosklerosis akan menurunkan kadar GSH peroksidase dan kadar protector eicosanoid prostacyclin (PGI-2) mengakibatkan balans prostaglandin menjadi lebih bersifat proinflamasi. Untuk itu diperlukan enzim GSH-S transferase yang bekerja di sel endotel untuk meningkatkan produksi dari protektor eicosanoid (Kidd P, 1997).

Flavonoid khususnya jenis quercetin dari ekstrak bawang bombay (*onion*), kaemferol dan apigenin meningkatkan konsentrasi glutathione (GSH) melalui aktivasi ekspresi dari γ -glutamylcysteine synthetase (GCS) heavy subunit (GCS_h) promoter (Myhrstad M.C.W. et al., 2002).

3.3 Senyawa Antioksidan Alami

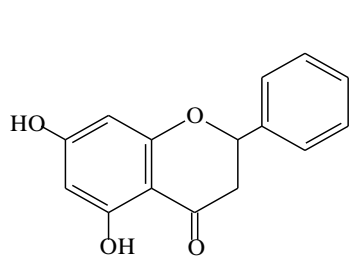
Senyawa antioksidan alami pada umumnya berupa vitamin C, vitamin E, karotenoid, senyawa fenolik, dan polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kuomarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, katekin, flavonol, dan kalkon. Turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat, dan lain-lain. Hal ini disebabkan karena gugus $-\text{OH}$ dan ikatan rangkap dua ($>\text{C}=\text{C}<$) yang dimiliki oleh senyawa –senyawa di atas (Fessenden and Fessenden, 1986 ; Muraay, 2009).

Mikronutrien yang terkandung dalam tumbuhan seperti vitamin A, C, E, asam folat, karotenoid, antosianin, dan polifenol memiliki kemampuan menangkap radikal bebas sehingga dapat dijadikan pengganti konsumsi antioksidan sintetis (Gill dkk. 2002). Hal ini dibuktikan oleh Shafie (2011) bahwa vitamin E yang diberikan pada mencit secara oral dapat mencegah terjadinya penyakit periodontal akibat terjadinya stres oksidatif. Wrasati (2011) menyatakan bahwa ekstrak bunga kamboja cendana dapat meningkatkan aktivitas enzim SOD, GPx dan Katalase. Zheng dan Wang (2009) menyatakan bahwa lebih dari 40 herbal

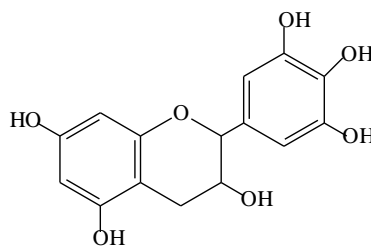
tanaman obat di Cina mempunyai aktivitas antioksidan yang cukup tinggi dan dari 40 herbal tersebut mengandung senyawa fenol yang tinggi termasuk diantaranya kandungan flavonoidnya yang tinggi. Hasil penelitian You, (2010) menyatakan bahwa kandungan senyawa fenol dan aktivitas antioksidan 40 species tanaman obat di Cina dapat dipergunakan untuk mencegah dan terapi penyakit *cardiovascular* dan *cerebrovascular*. Penelitian yang dilakukan oleh Cai, dkk. (2004) menyatakan bahwa kandungan senyawa fenolik dari 112 tanaman obat Cina memiliki koefisien korelasi positif dan sangat kuat ($R^2 = 96.4\%$) dengan aktivitas antioksidannya sehingga disimpulkan bahwa senyawa fenolik memberikan kontribusi yang signifikan pada kapasitas antioksidan tanaman obat.

Klopotek (2005) menyatakan bahwa kandungan vitamin C dan senyawa fenolik pada buah strawberi yang sudah mengalami pengolahan (prosesing) mengalami penurunan yang cukup signifikan. Hal ini mengakibatkan aktivitas antioksidan pada produk segar lebih tinggi dibandingkan dengan produk olahan. Penelitian yang dilakukan oleh Indriati dkk. (2002) menyatakan bahwa buah jambu mete yang mengalami penundaan pengolahan mengakibatkan penurunan senyawa polifenol yang dapat menurunkan aktivitas antioksidannya. Sementara itu penelitian yang dilakukan oleh Kobayashi dkk. (2008) menyatakan bahwa kandungan senyawa fenolik dan aktivitas antioksidan yang dianalisis dari buah “pawpaw” mengalami penurunan selama proses pematangan.

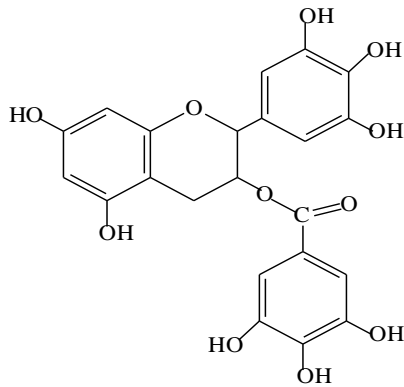
Gugus aktif yang umum berfungsi sebagai penangkap dan penghambat reaksi radikal bebas selanjutnya adalah gugus-gugus $-OH$ dan ikatan rangkap dua $>C=C<$ karena gugus-gugus ini dapat memberikan 1 molekul hidrogennya sehingga ROS menjadi stabil dan terbentuk radikal bebas baru yang kurang reaktif. Adapun struktur dari senyawa antioksidan yang merupakan metabolit sekunder dari tanaman (senyawa fitokimia) adalah



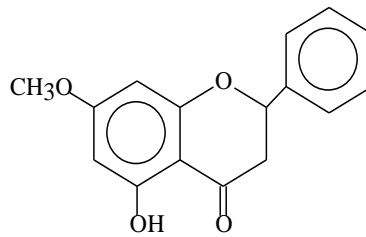
Pinocembrin (Flavonoid)



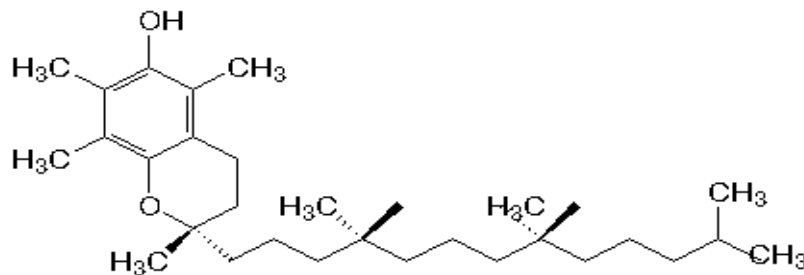
Epigallocatechin (EGC)



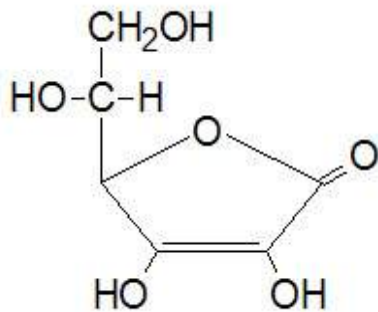
Epigallocatechin-gallate (EGCG)
(Daniel, 2010)



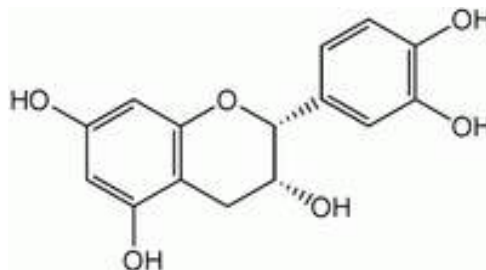
Pinostrobin



α -tokoferol (Vitamin E)
(Landvik *dkk.*, 2002)



Asam Ascorbat (Vitamin C)
(Padayatty *dkk.*, 2002)

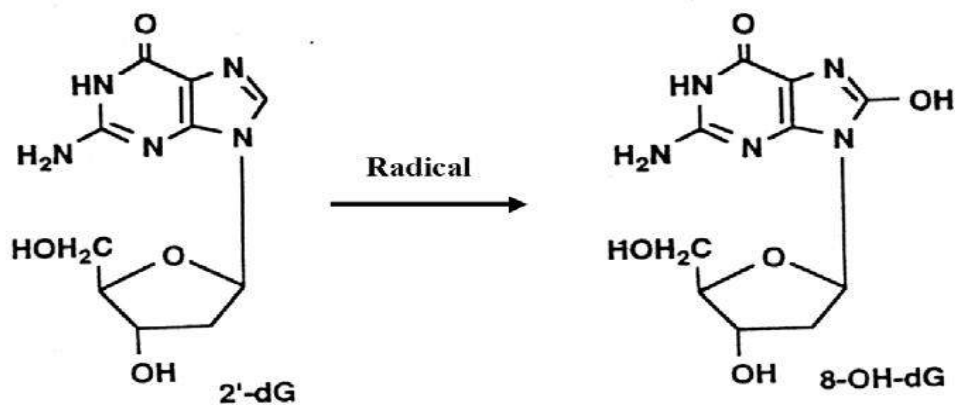


Quercetin
(Evans *dkk.*, 2010)

3.4 Peran Senyawa Metabolit Sekunder dalam mencegah Stress Oksidatif

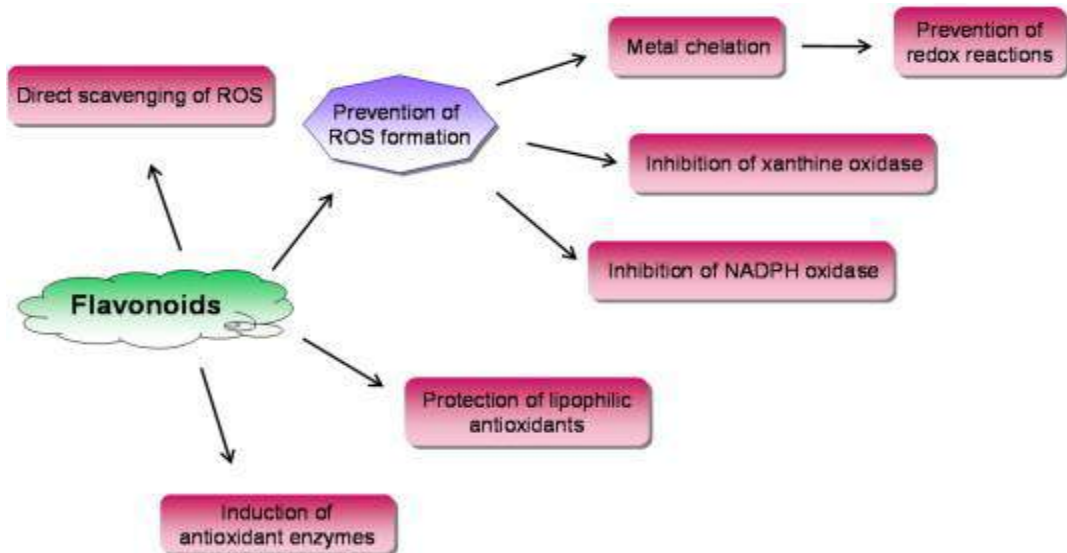
Senyawa-senyawa metabolit sekunder polifenol seperti flavonoid, poliena dan senyawa yang banyak mengandung gugus -OH ini adalah multifungsional dan dapat beraksi dengan radikal bebas sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam, dan (d) peredam terbentuknya singlet oksigen (Birt, 2001 ; Akhlaghi, 2009).

Senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak suatu tanaman diduga fungsinya dapat menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal-radikal bebas, baik yang eksogen maupun endogen. Reaksi oksidasi yang melibatkan radikal bebas khususnya radikal bebas $\cdot\text{OH}$ dapat merusak membran sel normal di sekitarnya dan merusak komposisi DNA sehingga dapat menyebabkan terjadinya suatu mutasi. Mutasi atau kerusakan komposisi suatu DNA dapat menyebabkan terjadinya beberapa penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini dan lain-lain (Muraay, 2009). 8-hidroksi-deoksiganosin (8-OHdG) merupakan marker yang menunjukkan terjadinya kerusakan DNA akibat radikal bebas yang berlebih. Hal ini disebabkan karena terjadinya oksidasi pada salah satu basa penyusun DNA yaitu Guanosisin. Guanosisin yang teroksidasi akan menjadi 8-OHdG seperti yang ditunjukkan oleh gambar berikut ini :



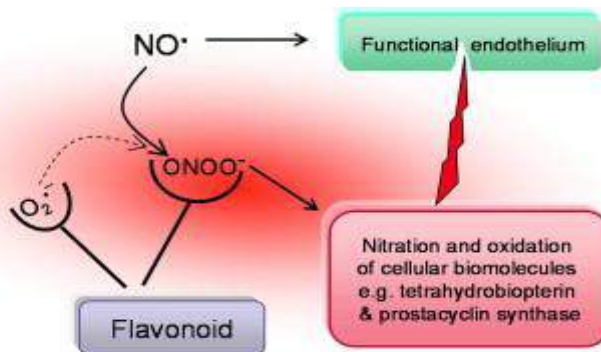
Gambar 2.9
Reaksi Guanosisin hidroksilasi menjadi 8-OHdG akibat adanya ROS
(H. Kasai dalam Chabowska, 2009)

Flavonoid dapat memberi efek antioksidan dengan mencegah generasi ROS, langsung menangkap ROS atau secara tidak langsung terjadi peningkatan enzim (Akhlaghi, 2009)



Gambar 2.10
Mekanisme pengaruh Flavonoid terhadap ROS
(Akhlaghi, 2009)

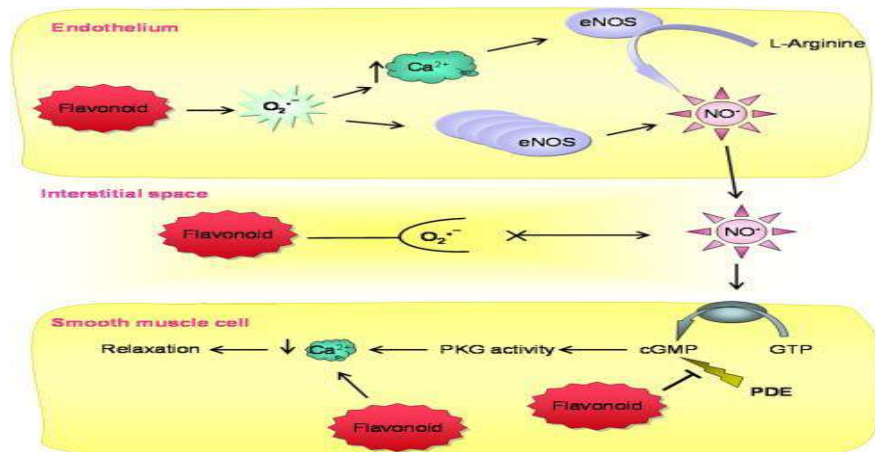
Flavonoid dapat menangkap secara langsung superoksida dan peroxyinitrite. Melalui penangkapan superoksida, flavonoid meningkatkan bioavailabilitas NO dan menghambat pembentukan peroxyinitrite. Flavonoid juga dapat menangkap peroxyinitrite yang merusak vasorelaxation endotelium dan mengganggu endotelium, sehingga pada akhirnya sirkulasi darah yang lebih baik dalam arteri koroner (Akhlaghi, 2009) seperti dalam gambar berikut ini



Gambar 2.4
Pengaruh flavonoid terhadap Radikal NO*
(Akhlaghi, 2009)

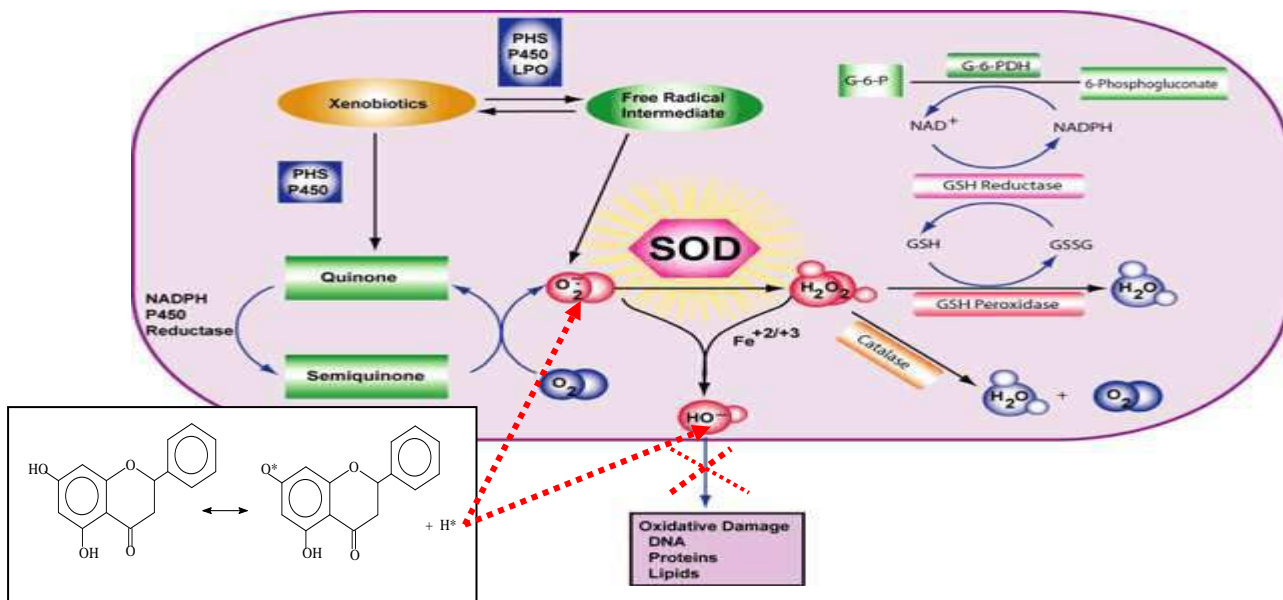
Pengaruh flavonoid pada endothelium tergantung vasorelaxation. Pengaruh ringan Flavonoid pada O_2^* mungkin bertanggung jawab pada induksi eNOS serta peningkatan ringan sitosolik Ca^{2+} sebagai kofaktor untuk aktivasi eNOS. Selain itu, melalui penangkapan

superoksida dalam cairan interstitial, flavonoid melindungi *NO. Kemungkinan mekanisme lain vasorelaxation flavonoid adalah penghambatan phosphodiesterases (PDE) dan menurunkan Ca^{2+} dalam sel otot polos (Akhlaghi, 2009) seperti yang ditunjukkan oleh gambar berikut ini :



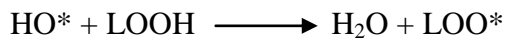
Gambar 2.5
Pengaruh flavonoid pada radikal superoksida
(Akhlaghi, 2009)

Flavonoid dapat menghambat terjadinya kerusakan DNA akibat reaksi HO^* dengan basa-basa nitrogen dari DNA dan merangsang terbentuknya antioksidan enzimatik seperti SOD, katalase dan GPx. Adapun Mekanisme reaksinya dapat dilihat pada gambar di bawah ini :

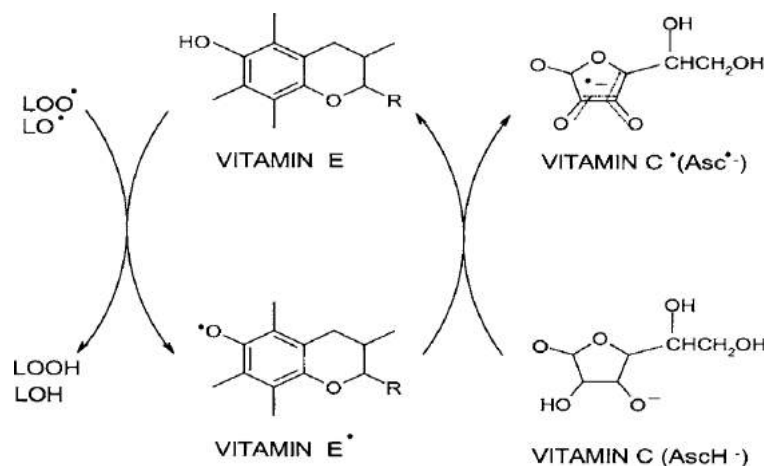


Gambar 2.6
Mekanisme kerja flavonoid dalam menangkap ROS
(Oberley dalam Zainuri, 2012)

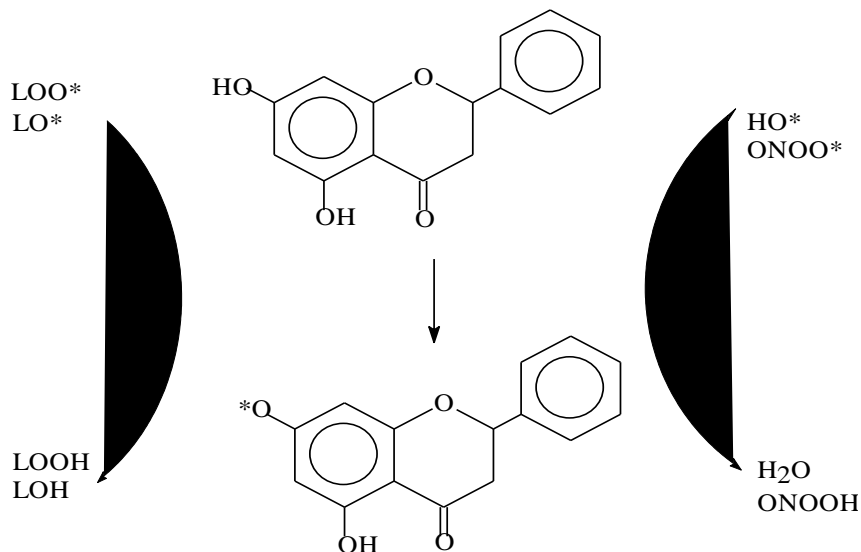
Flavonoid, Vitamin C dan Vitamin E yang diisolasi dari alam dapat melindungi membran phospholipid FUPA dengan menyumbangkan atau memberikan salah satu ion Hidrogennya (H^+) kepada peroksil lipid radikal (LOO^*). LOO^* merupakan hasil reaksi HO^* pada proses peroksidasi lipid rekasi serangan HO^* terhadap PUFA (Poly Unsaturated Fatty Acid / asam lemak tak jenuh jamak rantai panjang) Pemberian H^* oleh suatu antioksidan dapat menghentikan reaksi-reaksi radikal selanjutnya, seperti reaksi-reaksi berikut ini : (Hamid, 2010)



FL-OH = flavonoid dan FL-O* = radikal flavonoid yang kurang reaktif.

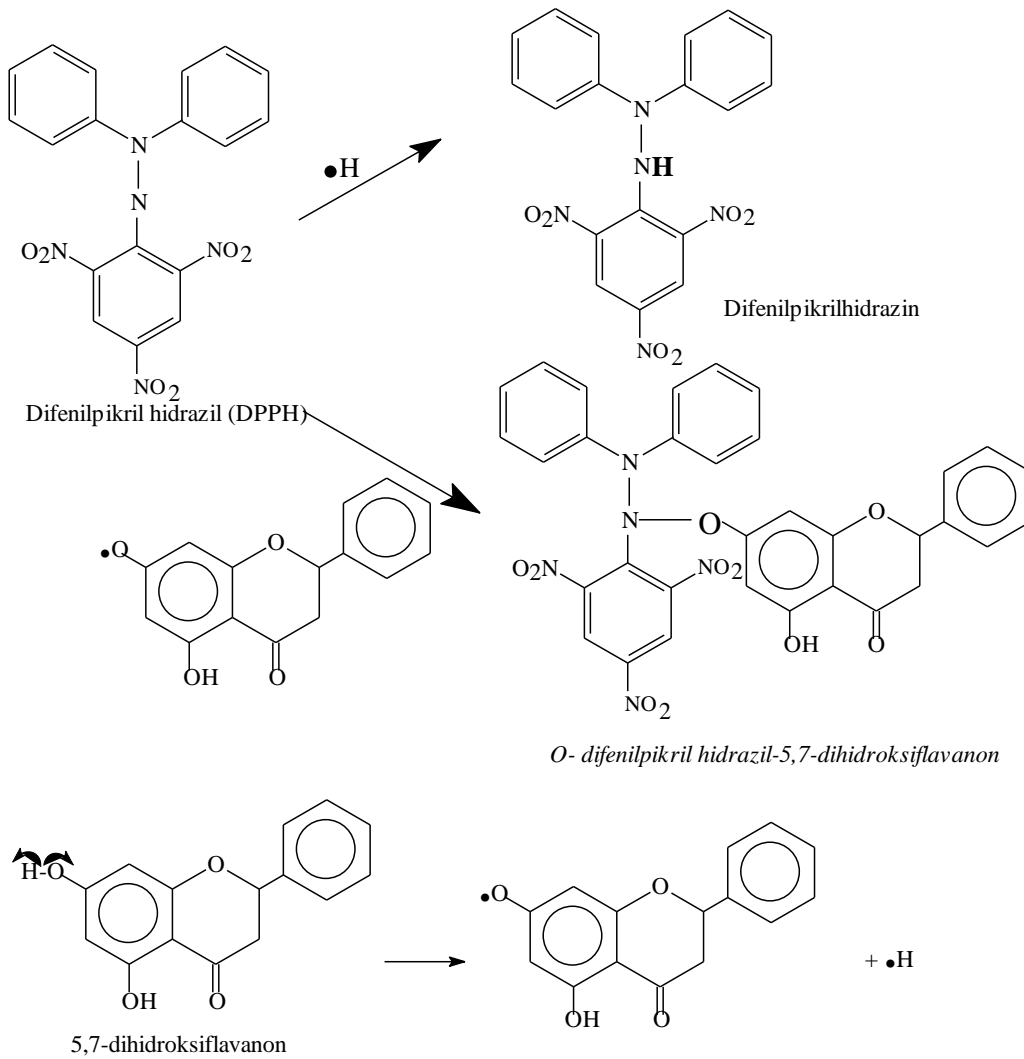


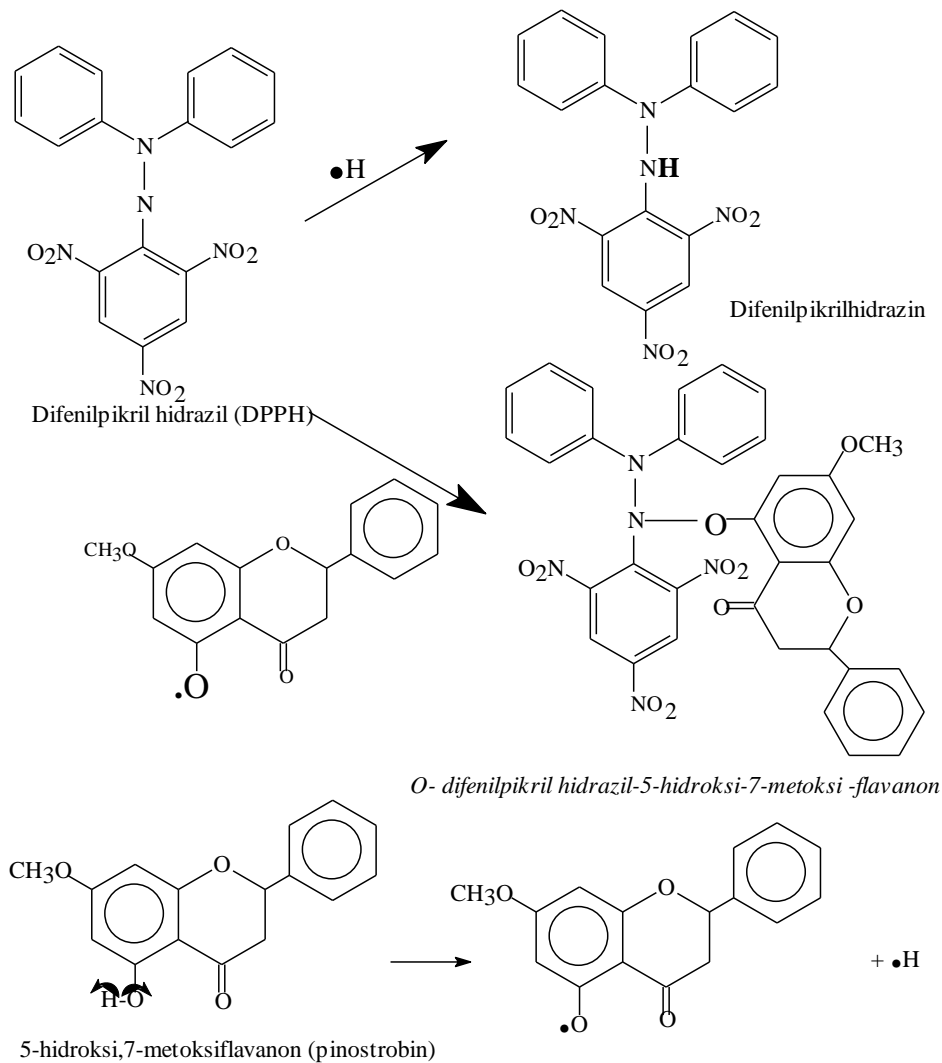
Gambar 2.7
Mekanisme Peran Vit.E dan Vit. C dalam melindungi lipida
(Valko, 2004)



Gambar 2.11
Mekanisme Flavonoid dalam melindungi reaksi ROS
(Hamid, 2010)

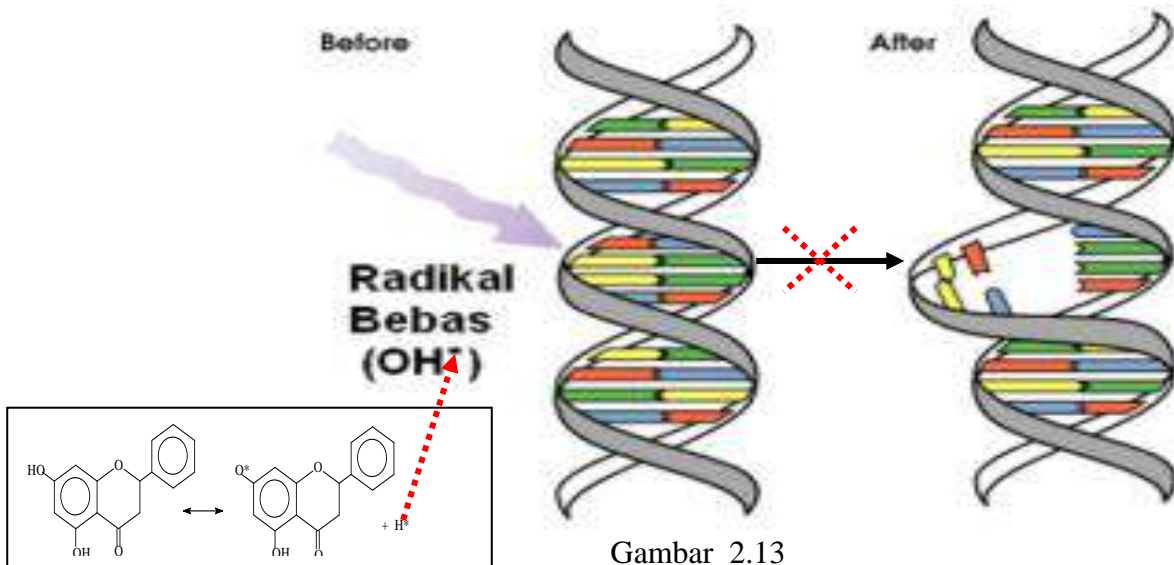
Contoh reaksi flavonoid yang sudah terbukti sebagai radikal bebas adalah pinocembrin (5,7-dihidroksiflavanon) dan pinostrobin (5-hidroksi-7-metoksiflavanon) yang diekstraksi pada rimpang temu kunci (*Kaempferia pandurata* Roxb). Reaksi ini dipergunakan dalam mengukur kapasitas antioksidan suatu flavonoid hasil isolasi dengan DPPH (radikal bebas yang stabil)





Gambar 2.12
Reaksi DPPH dengan Antioksidan Alami

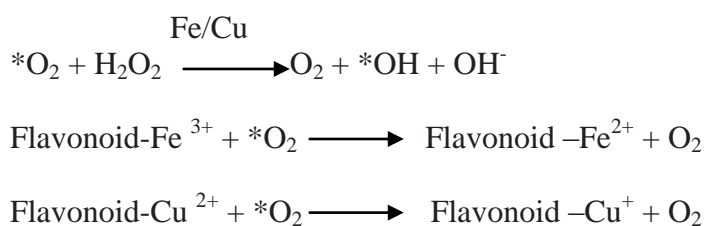
Reaksi-reaksi di atas dapat dikatakan bahwa flavonoid dapat melindungi tubuh kita dari reaksi-reaksi lanjutan dari ROS dan RNS dengan menangkap ROS, memblokir reaksi propagasi dan merangsang terbentuknya antioksidan endogen seperti GPx, SOD dan Katalase serta menurunkan kadar MDA karena tidak terjadinya peroksidasi lemak (PUFA) dan menurunkan kadar 8-OHdG karena HO* yang biasanya masuk bereaksi ke dalam DNA sudah ditangkap oleh flavonoid seperti yang ditunjukkan oleh gambar berikut ini :



Gambar 2.13
Mekanisme Flavonoid dalam menangkap HO*
(Cooke, 2007)

Flavonoid dapat berfungsi sebagai antiinflamasi karena flavonoid dapat menghambat terbentuknya sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-6, IL-1 β dan interferon- γ (Akhlaghi, 2009).

Flavonoid dapat berfungsi sebagai zat pengkelat dari logam-logam Cu dan Fe yang berfungsi sebagai katalis dalam reaksi Fenton. Reaksi ini termasuk reaksi perubahan Hidrogen Peroksida menjadi *OH. Proses khelat ini akan menurunkan aktivitas katalitik dari logam Cu dan Fe sehingga akan mengurangi terbentuknya radikal *OH dan secara otomatis akan menurunkan proses kerusakan DNA dan proses peroksidasi lemak (PUFA), seperti reaksi berikut ini : (Valko, 2004 : Akhlaghi, 2009)

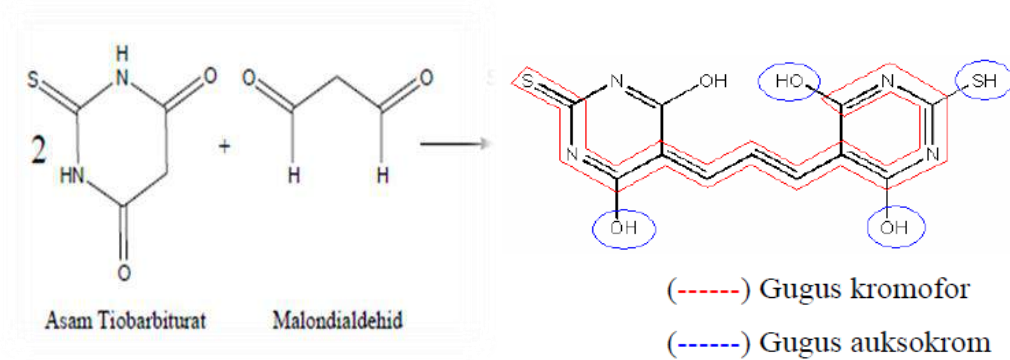


3.5 Malondialdehida

Menurut Tokur dkk. (2006), malondialdehida (MDA) merupakan produk enzimatik dan nonenzimatik dari pemecahan prostaglandin endoperoksida dan produk akhir dari lipid peroksidasi. MDA merupakan molekul reaktif yang memiliki rumus molekul C₃H₄O₂ dan dikenal sebagai penanda (marker) peroksidasi lipid.

Pengukuran MDA banyak dilakukan oleh para peneliti sebagai indeks tidak langsung dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh peroksidasi lipid. Tokur dkk. (2006)

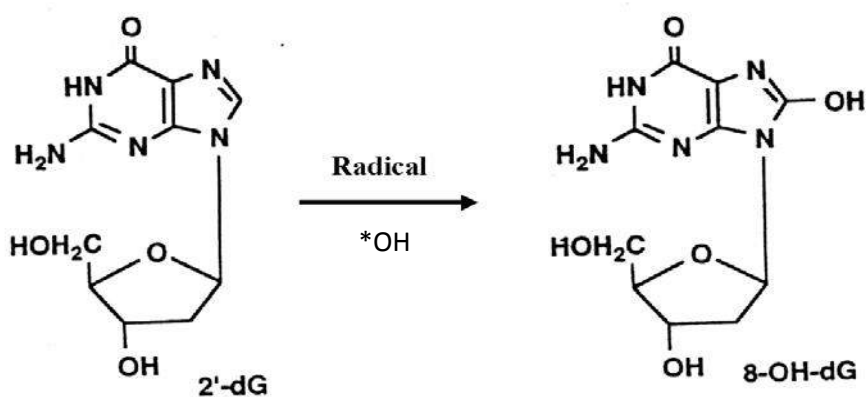
menyatakan bahwa prinsip pengukuran MDA adalah reaksi 1 molekul MDA dengan 2 molekul asam tiobarbiturat (TBA) membentuk kompleks senyawa MDA-TBA yang berwarna pink dan kuantitasnya dapat dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 532 – 533 nm (Jamil, 2010 ; Mudasir, dkk. 2011). Adapun reaksi dalam pengukuran MDA ini adalah :



Gambar 2.14
Reaksi TBA dengan MDA

3.6 8-hidroksi-deoksiguanosin

Deoksiguanosin (dG) merupakan salah satu basa penyusun DNA dan bila mengalami reaksi oksidasi akan menjadi 8-hidroksi-2'-deoksiguanosin (8-OHdG). Guanosin juga dapat mengalami hidroksilasi sebagai respon metabolisme normal ataupun akibat faktor pencemaran lingkungan oleh logam-logam berat dan radikal seperti yang ditunjukkan dalam Gambar 2.17 berikut ini :



Gambar 2.17
Reaksi Guanosin hidroksilasi menjadi 8-OHdG akibat adanya ROS
(Chabowska, *et.al.*, 2009)

Peningkatan kadar 8-OHdG berhubungan dengan kelainan patologi atau penyakit mencakup depresi, kanker, diabetes, dan hipertensi (Chabowska, *et.al.*, 2009 ; Gupta, *et.al.*, 2010). Hal ini dibuktikan dengan beberapa penelitian yaitu 8-OHdG ditemukan mengalami penurunan secara signifikan pada kelompok wanita hamil yang diberikan olahraga kategori sedang dibandingkan dengan kelompok tanpa olahraga kategori sedang. Olahraga dengan kategori sedang (*submaximal exercise*) mempengaruhi fungsi neuroendokrin untuk merangsang pembentukan hormon dan menyebabkan suhu badan meningkat diduga merupakan salah satu penyebab terjadinya peningkatan produksi hormon prolaktin dan penurunan produksi *growth* hormon (Chevion, *et.al.*, 2003).

Forlenza (2006) menyatakan bahwa terdapat peningkatan yang signifikan antara kadar 8-OHdG pasien normal dengan pasien depresi berat. Pasien depresi memberikan kadar 8-OHdG lebih tinggi 0,5 SD (standar deviasi) dibandingkan dengan pasien normal.

Penelitian yang dikerjakan sebuah tim di Pusat Kanker Arizona, Tucson. Penelitian terhadap 118 perokok berat. Para perokok dibagi menjadi dua kelompok. Hasil yang diperoleh setelah perlakuan 4 bulan. Pada mereka yang meminum teh hijau decaffein selama 4 bulan terjadi penurunan sebanyak 31% jumlah 8-OHdG. Sedangkan pada yang meminum teh hijau tanda-tanda itu tidak dapat ditemukan terjadinya perubahan. Hal ini disebabkan karena kandungan senyawa fenolat EGC dan EGCG yang merupakan zat antioksidan alami (Hakim *et.al.*, 2003 ; Wiratno, 2009).

Mekanisme kerusakan DNA akibat reaksi radikal bebas ROS sebagai respon metabolisme normal ataupun akibat faktor lingkungan lainnya, disebabkan karena radikal *OH akan menyerang 2'dG (2'deoksi-Guanosin) menjadi 8-OH-dG (8-hidroksi-2'deoksi guanosin). Kadar 8-OH-dG inilah yang dipergunakan sebagai marker kerusakan DNA akibat radikal bebas berlebih dalam tubuh.

3.7 Stres Oksidatif

Stres oksidatif adalah keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan jumlah radikal yang ada di dalam tubuh dengan antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh sendiri. Ketidakseimbangan inilah yang menyebabkan tubuh tidak bisa menangkap atau menetralkan keseluruhan radikal bebas tersebut. Kelebihan radikal bebas ini mengakibatkan intensitas reaksi oksidasi sel-sel normal semakin tinggi dan mengakibatkan kerusakan jaringan sel akan semakin parah.

Kelebihan radikal bebas juga akibat aktivitas tubuh yang berlebih, puasa yang berlebih, asap rokok, radiasi dan pencemaran udara. Adanya kejadian seperti ini akan merangsang pengeluaran sitokin proinflamasi seperti Interleukin-6 (IL-6) atau Tumor Nekrosis Faktor-alpha (TNF- α) dan memicu pengeluaran PMN. PMN inilah yang menghasilkan radikal bebas berupa superoksida anion, *hydroxyl radical*, *nitrous oxide* dan *hydrogen peroxide* yang merusak jaringan sel seperti pada gingiva, ligamen periodontal dan tulang alveolar. Hal inilah merupakan awal terjadinya kerusakan oksidatif yang dikenal sebagai stres oksidatif (Zheng dan Wang, 2009)

Latihan fisik yang maksimal dapat memicu ketidakseimbangan antara produksi radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan tubuh yang dikenal dengan stres oksidatif. Selama latihan fisik maksimal, konsumsi oksigen seluruh tubuh meningkat 20 kali sedangkan konsumsi oksigen pada serabut otot diperkirakan meningkat 100 kali lipat. Hal ini dapat mengakibatkan tubuh akan banyak kekurangan oksigen yang dikenal dengan keadaan hipoksia. Peningkatan konsumsi oksigen ini berakibat meningkatnya produksi radikal bebas yang dapat mengoksidasi lemak pada jaringan otot (peroksidasi jaringan lemak otot) sehingga menyebabkan kerusakan sel-sel otot (Chevion, 2003).

Pelatihan fisik memulai respon fisiologis dan biokimia yang kompleks. Setiap gerakan otot yang cepat dimulai dengan metabolisme anaerobik. Tenaganya berasal dari pemecahan ATP dengan hasil ADP atau AMP dan berlangsung di mitokondria. Pelepasan energi disertai dengan meningkatnya aliran elektron dalam rangkaian respirasi mitokondria menyebabkan terbentuknya oksigen reaktif (O_2^-) dan H_2O_2 dalam upaya pembentukan ATP (Chevion,2003).

Pelatihan cenderung mengosongkan ATP dan meningkatkan jumlah ADP yang tentunya akan merangsang ADP katabolisme dan konversi *Xanthine dehydrogenase* menjadi *Xanthene oxidase*. *Xanthene oxidase* inilah akan membentuk radikal bebas (O_2^-). Terbentuknya radikal bebas akan menyebabkan ketidakseimbangan yang disebut sebagai stress oksidatif dengan hasil akhir rusaknya lemak, protein dan DNA.

Stres oksidatif juga terjadi akibat menurunnya jumlah oksigen dan nutrisi, sehingga menimbulkan proses iskemik dan kerusakan mikrovaskular. Keadaan ini disebut dengan *Reperfusion Injury*. Hal ini juga dapat memicu terjadinya kerusakan jaringan karena produksi radikal bebas yang berlebih (Sasaki and Joh , 2007).

Ekspresi sitokin proinflamasi seperti TNF- α dan IL-1 β akan meningkat dalam beberapa jam setelah terjadi lesi iskemik. Sitokin memberikan kontribusi terhadap perluasan

infark pada periode post iskemik baik secara langsung maupun melalui induksi pembentukan neurotoksik seperti NO. TNF- α juga memberikan kontribusi pada kematian neuron lewat proses apoptosis. Reperfusi dilakukan segera setelah sumbatan pembuluh darah dapat menormalkan kembali fungsi neuron, namun bila terjadi setelah iskemia, maka reperfusi tidak dapat menghambat kerusakan neuron. Adhesi molekul juga dilepaskan, sehingga neutrofil, monosit dan makrofag, kemudian akan segera melekat pada lapisan endotel menyebabkan oklusi mikrovaskuler. Sebaliknya reperfusi pada jaringan yang sudah mengalami iskemik justru akan berbahaya karena menimbulkan peningkatan infiltrasi sel inflamasi dan oksigen yang dapat meningkatkan pembentukan radikal bebas (Siswonoto, 2008).

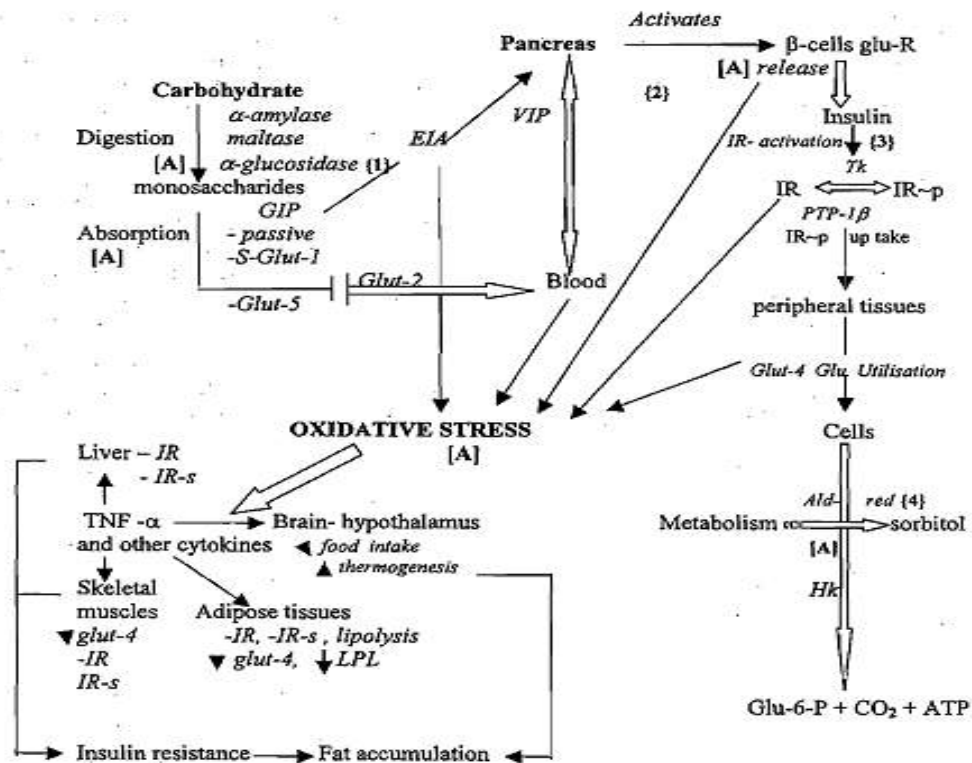
Iskemia otak akut akan mengaktifasi program gen yang kompleks, yang akan memunculkan rangkaian ekspresi sejumlah gen. Gen yang muncul segera (*immediate early response*) adalah c-fos, c-jun, krox-20, zif/268 dll. Respon gen ini sifatnya tidak spesifik dan terjadi dengan adanya kerusakan sel termasuk iskemia. Saat ini telah terbukti ekspresi gen ini dan *heat shock* protein berhubungan dengan gen yang mengkode proses apoptosis sel. Rangkaian ekspresi yang muncul kemudian adalah gen yang mengkode molekul yang berhubungan dengan kematian sel lambat (*delayed neuronal death*) yang meliputi sitokin pro inflamasi (TNF α , IL1-b, IL-6, MCP-1, CINC) dan adhesi molekul (ICAM 1, ELAM-1, P-selektin). Sintesis beberapa enzim juga muncul, seperti iNOS dan COX-2 yang berakibat timbulnya stres oksidatif (Siswonoto, 2008).

Bergesernya pola kehidupan di negara berkembang seperti Indonesia, akan berdampak terhadap pergeseran pola makan, serta kebiasaan seseorang, hal ini akan berdampak terhadap meningkatnya penyakit *hiperlipidemia*, *hiper kholesterolemia*, *aterosklerosis*, *penyakit jantung koroner*, *diabetes mellitus* dan lain-lain (Asj'ari, 2000).

Tingginya penderita penyakit jantung koroner salah satu pemicunya karena *hiperlipidemia*, dan salah satu parameter untuk menunjukkan *hiperlipidemia* adalah nilai kholesterol. Oksidasi asam lemak tak jenuh ganda menghasilkan senyawa malondialdehid (MDA), 4-hidroksi noneal (HNE), trans-4-hidroksi-2- heksenal (HHE), isoproston, etan, pentan dan lainlain. Asam lemak tak jenuh yang mengalami peroksidasi yang membentuk produk MDA (Malondialdehid) juga akan bereaksi dengan protein tubuh dan menyebabkan pembentukan senyawa yang bersifat karsinogen (Halliwell dan Gutteridge, 2000 ; 2007). Salah satu tolok ukur yang menentukan seberapa banyak oksidan terbentuk didalam tubuh adalah dengan diketahuinya kadar MDA di dalam tubuh (Siswonoto, 2008).

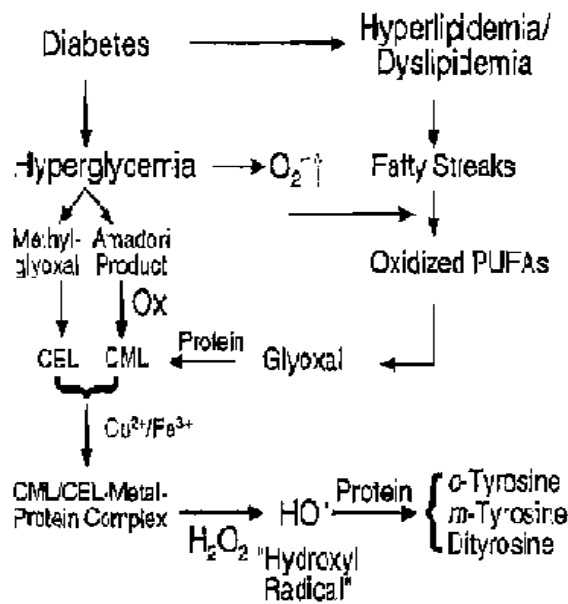
Oksidasi molekul glukosa dan oksidasi molekul glukosa yang berikatan dengan protein (*glycated protein*) dapat menghasilkan ROS. Reaksi oksidasi glukosa dan proses glikasi glukosa dan protein dapat menghasilkan AGEs (*Advanced glycation end product*). Pembentukan AGEs merupakan proses *irreversible* yaitu suatu proses yang tidak dapat balik dan lama sehingga dapat merusak jaringan sekitarnya. Molekul-molekul monosakarida dapat dioksidasi dan dikatalisis oleh ion Fe dan Cu menghasilkan $*O_2$, H_2O_2 , $*OH$ dan karbonil toksik. Struktur kimia AGEs meliputi *carboxymethyllysine* dan *pentosidine*. *Glycated protein* dan *AGEs modified protein* dapat mengakibatkan stres oksidatif. Pada keadaan normal AGEs dapat dikenal oleh makrofag melalui reseptor AGEs (RAGE= *receptor for AGEs*) yang mana selanjutnya makrofag akan menelan sel-sel tersebut (Widowati, 2007).

Perubahan pola makan dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif yang selanjutnya akan menyebabkan terjadinya penyakit degeneratif seperti Diabetes Melitus. Stres oksidatif pada penderita diabetes melitus (DM) meningkatkan hasil glikosidasi dan liposidasi di dalam plasma sehingga dapat mengakibatkan terjadinya komplikasi. Salah satu sumber stres pada penderita DM terjadi karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang meningkatkan produksi ROS dari hasil samping reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan endogen seperti SOD, GPx dan katalase (Widowati, 2007). Skema terbentuknya ROS dalam proses ini ditunjukkan dalam skema berikut ini :



Gambar 2.15
Metabolisme karbohidrat dan proses timbulnya DM
(Tiwari dkk. 2002 dalam Widowati, 2007)

Hiperglikemia akan memperburuk dan memperparah pembentukan ROS. ROS yang terbentuk akan meningkatkan pembentukan ekspresi TNF- α sehingga dapat memperparah stres oksidatif pada penderita DM dan selanjutnya akan terjadi komplikasi pada penyakitnya. Hiperglikemia akan mengkatalisis pembentukan radikal anion superoksida ($*O_2^-$) dari mitokondria dan sitoplasma dan menyebabkan terjadinya lipoksidasi seperti yang ditunjukkan dalam gambar 2.16 berikut ini :



Gambar 2.16
 Hubungan DM dan Hiperlipidemia dalam produksi ROS.
 (Pennatur, 2001 dalam Widowati,2007)

Jawi, dkk. (2008) menyatakan bahwa ubi jalar ungu dapat dipergunakan sebagai antioksidan alami karena dapat menurunkan kadar MDA dalam darah dan hati mencit setelah diberikan aktivitas fisik maksimal. Sugianto, (2011) menyebutkan bahwa pemberian jus delima merah dapat meningkatkan kadar GPx pada darah mencit dengan aktivitas fisik maksimal. Wresdiyanti dkk. (2010) menyatakan bahwa α -tokoferol dapat meningkatkan SOD dan menurunkan MDA jaringan hati tikus dibawah kondisi stres. Kelebihan produksi radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya kerusakan DNA. Kerusakan DNA ini biasanya ditunjukkan tingginya kadar 8-hidroksi-deoksiganosin (Murray, 2009).

Stres oksidatif bisa terjadi pada hewan coba seperti mencit dan tikus karena adanya pemaparan zat-zat kimia, radiasi, puasa dan pelatihan maksimal, hal ini dibuktikan naiknya kadar MDA, AST, ALT dan 8-OHdG serta turunnya aktivitas antioksidan enzimatik SOD, GPx dan Katalase yang ada pada hewan coba tersebut. Hal ini dibuktikan dengan beberapa hasil penelitian. Mencit yang diberikan aktivitas maksimal berupa renang yang hampir tenggelam selama 45 menit ternyata dapat menaikkan kadar MDA dan menurunkan aktivitas SOD pada darah mencit (Jawi, 2008). Pelatihan maksimal pada tikus berupa renang selama 65 menit tiap hari selama 35 hari dapat menaikkan kadar MDA darahnya (Binekada, 2002). Pelatihan maksimal pada mencit tiap hari selama 45 menit tiap hari selama 14 hari dapat menurunkan aktivitas GPx (Sugianto, 2011). Pelatihan maksimal pada mencit dengan diberikan renang selama 45 menit dapat menaikkan marker stres oksidatif AST dan ALT

pada darahnya (Rahmadi, 2010). Pemaparan sinar UV pada tikus selama 60 hari dapat menaikkan kadar MDA dan 8-OHdG (Maryam S. 2011). Perlakuan puasa dan pelatihan renang 5 menit tiap hari selama 5 hari pada tikus dapat menaikkan kadar MDA dan menurunkan aktivitas enzim SOD darahnya (Wresdiyati, 2002).

3.8 Kapasitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan menggambarkan kemampuan suatu senyawa antioksidan untuk menghambat laju reaksi pembentukan radikal bebas. Penentuan kapasitas antioksidan secara *in vitro* ditentukan secara spektroskopi UV-Vis. Eksplorasi senyawa fitokimia terutama senyawa bioaktif yang terdapat pada tanaman obat atau bukan tanaman obat secara terus menerus diteliti untuk mendapatkan senyawa antioksidan yang berfungsi untuk menjaga kesehatan tubuh manusia dari serangan suatu penyakit (Prakash, 2001).

Pengujian aktivitas antioksidan harus didasari atas efek farmakologis dari zat tersebut diantaranya adalah

1. Menyerupai aktivitas antioksidan endogen seperti SOD sintetis, katalase rekombinan.
2. Menangkap ion logam yang diperlukan untuk tujuan katalisis reaksi oksidasi oleh radikal bebas seperti deferoksamin.
3. Menangkap (*scavenging*) atau memutus reaksi rantai (*chainbreaking*) dari radikal bebas seperti Vitamin C, E, β -karoten dan senyawa fenol (flavonoid)
4. Menghambat aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas seperti allopurinol.

BAB IV

METODA ANALISIS SENYAWA ANTIOKSIDAN

Senyawa antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dari radikal bebas dengan cara menetralkan radikal bebas tersebut. Pengujian aktivitas antioksidan harus didasari atas efek farmakologis dari zat tersebut diantaranya adalah

1. Menyerupai aktivitas antioksidan endogen seperti SOD sintesis, katalase rekombinan.
2. Menangkap ion logam yang diperlukan untuk tujuan katalisis reaksi oksidasi oleh radikal bebas seperti deferoxamin.
3. Menangkap (*scavenging*) atau memutus reaksi rantai (*chainbreaking*) dari radikal bebas seperti Vitamin C, E, β -karoten dan senyawa fenol (flavonoid)
4. Menghambat aktivitas enzim-enzim yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas seperti allopurinol.

Analisis suatu senyawa antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* (di luar sel) dan *in vivo* (di dalam sel). Secara *in vitro* (di luar sel) dapat ditentukan Kapasitas Antioksidannya sedangkan secara *in vivo* (di dalam sel) dapat ditentukan aktivitas antioksidan endogennya seperti aktivitas enzim SOD, GPx dan Katalase atau kadar Malondialdehid dan kadar 8-OHdG.

Kapasitas antioksidan dapat diukur dengan metoda spektroskopi UV-Vis dengan menggunakan DPPH, sedangkan aktivitas antioksidan secara *in vivo* dapat dilakukan dengan metoda ELISA dan imunohistokimia.

4.1 Kapasitas Antioksidan

Beberapa metode pengukuran kapasitas antioksidan secara *in vitro* yang digunakan dewasa ini adalah beta karoten bleaching, *1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl* (DPPH Radical Scavenging) method, *Thiobarbituric Acid-Reactive-Substances* (TBARS) assay, *Rancimat* assay, *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) assay, *Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter* (TRAP) dan *Ferric Reducing/Antioxidant Power* (FRAP) assay, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) method, *Peroxyl Radical Scavenging Capacity* (PSC) dan *Total Oxyradical Scavenging Capacity* (TOCS) method dan Folin-Ciocalteu Total Phenolic Assay dan lain-lain (Zou, *et.al.*, 2004 ; Aicha, *et.al.*, 2006 ; Mermelstein, 2009).

Klopotek, *et.al.*, (2005) menyatakan bahwa metode *FRAP assay* dan *TEAC assay* yang digunakan untuk mengukur perubahan aktivitas antioksidan buah strawberi segar dan olahannya memberikan hasil yang tidak jauh berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Gill, *et al.* (2002) menghasilkan bahwa aktivitas antioksidan pada buah plum menggunakan FRAP assay lebih tinggi (40.4 mg sampai dengan 127.2 mg ekuivalen vitamin C) dibandingkan pengukuran dengan DPPH Radical Scavenging Method (27.4 mg sampai dengan 61.1 mg ekuivalen vitamin C). Penelitian lain menunjukkan bahwa analisis aktivitas antioksidan menggunakan Total Phenolic Assay dan FRAP assay memiliki hubungan positif yang sangat kuat ($R^2 = 94.8\%$) antara daun, batang, dan ekstrak buah tanaman *Momordica charantia* L (Kubola and Siriamornpun, 2008).

4.1.1 Pengukuran Kapasitas Antioksidan dengan standar Asam Galat

Analisis Kapasitas antioksidan di mulai dengan pembuatan larutan standar asam galat, selanjutnya dibuat kurva kalibrasi antara konsentrasi asam galat.dengan berbagai konsentrasi (0-100 mg/L).. Perlakuan pada sampel dilakukan dengan menimbang 0,1 gram sampel pada masing-masing sport , selanjutnya diencerkan dengan metanol 99,9% sampai volume 5 mL dalam labu lalu divortek untuk menghomogenkan larutan , selanjutnya larutan disentrifuge 3000 ppm selama 15 menit.Standar dan supernatan / plasma darah dipipet 0,5 mL dan ditambahkan 3,5 mL DPPH 0,1 mM dalam pelarut metanol pada tabung reaksi,lalu divortex. Larutan ini selanjutnya diinkubasi pada suhu 25⁰C selama 30 menit agar DPPH ada waktu untuk bereaksi dengan atom H yang diberikan atau didonorkan oleh antioksidan sampel,ukur absorbansinya pada λ mak 517 nm. Kapasitas antioksidan dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier $y = ax + b$ (Almey, 2010).

Melalui hasil ini dapat diperlihatkan harga persen hambatan atau IC₅₀ dimana pada konsentrasi ini senyawa dapat menghambat 50% reaksi oksidasi dari radikal bebas.

4.1.2 Pengukuran Kapasitas Antioksidan dengan DPPH

Pengujian antiradikal bebas senyawa-senyawa bahan alam atau hasil sintesis secara UV-Vis dapat juga dilakukan secara kimia menggunakan DPPH (difenilpikril hidrazil). DPPH berfungsi sebagai senyawa radikal bebas stabil yang ditetapkan secara spektrofotometri melalui persen peredaman absorbansi. Peredaman warna ungu merah pada panjang gelombang (λ) 517 nm dikaitkan dengan kemampuan minyak atsiri sebagai

antiradikal bebas. Penggunaan metode spektroskopi ini sudah divalidasi dengan pengukuran beberapa antiradikal bebas yang umum seperti **tokoferol, vitamin C, pinocembrin, dan skualen** yang memberikan hasil yang signifikan dengan uji antiradikal bebas yang lain.

Keaktifan dari golongan senyawa-senyawa yang berfungsi sebagai antiradikal bebas ditentukan adanya **gugus fungsi –OH (hidroksil) bebas dan ikatan rangkap karbon-karbon**, seperti **flavon, flavanon, skualen, tokoferol, β-karoten, vitamin C**, dan lain-lain.^(7,10)

Daun sirih digunakan untuk mengatasi sariawan, radang tenggorokan, kanker mulut, dan lain-lain. Hal ini yang melatar belakangi daun sirih diindikasikan sebagai zat antikanker, dimana kanker akan muncul bila sel normal mengalami kerusakan sehingga menyebabkan mutasi genetik, penyebab dari rusaknya DNA sel normal diantaranya adalah radikal bebas dan senyawa-senyawa karsinogenik. Ini dikarenakan radikal bebas mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat atau DNA yang pada akhirnya menyebabkan kanker, penuaan dini, peradangan, jantung koroner, dan lain-lain. Untuk itulah diperlukan **zat antioksidan yang mampu bereaksi dengan radikal bebas**.

Kapasitas antiradikal bebas DPPH diukur dari peredaman warna ungu merah dari DPPH pada panjang gelombang 517 ± 20 nm. Perhitungan kapasitas antiradikal bebas sebagai **persen peredaman (% peredaman DPPH) absorbansi pada puncak 517** menggunakan persamaan berikut ini :

$$\left(1 - \frac{\text{absorbansi hitung sampel}}{\text{absorbansi hitung DPPH}} \right) \times 100\%$$

Absorbansi hitung sampel dan DPPH pada puncak 517 mn dapat dihitung menggunakan persamaan berikut ini :

$$A_{517} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$

Nilai **0%** berarti **tidak mempunyai aktivitas antiradikal bebas**, **100%** berarti peredaman total dan pengujian perlu dilanjutkan dengan **pengenceran sampel** untuk mengetahui batas

konsentrasi aktivitasnya. **Suatu bahan dapat dikatakan aktif sebagai antiradikal bebas bila prosentase peredamannya lebih dari atau sama dengan 50%.**

Metoda Kerja

1. Preparasi Sampel

Isolat atau ekstrak yang diperoleh dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 ± 20 nm.

2. Pengukuran Absorbansi DPPH

Dilarutkan DPPH sesuai dengan pelarut sampel (metanol) kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 ± 20 nm.

3. Pengukuran Absorbansi dan Sampel

Larutan DPPH ditetesi larutan sampel kemudian ukur kembali absorbansinya pada panjang gelombang 517 ± 20 nm, ukur absorbansinya setiap 5 menit dan 60 menit. Kemudian Hitung % peredaman sampel terhadap DPPH dengan formula sbb :

$$\left(1 - \frac{\text{absorbansi hitung sampel}}{\text{absorbansi hitung DPPH}} \right) \times 100\%$$

$$A_{517} - \frac{A_{497} + A_{537}}{2}$$

4.2 Pengukuran Aktivitas Antioksidan Endogen

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan mengukur kadar Malondialdehid (MDA) sebagai hasil terjadinya peroksidasi lemak dan kadar 8-hidroksi-deoksi-guanosin (8-OHdG) sebagai indikator terjadinya kerusakan sel. Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan pengukuran kenaikan aktivitas enzim SOD, GPX dan katalase. Pengukuran aktivitas antioksidan ini dapat dilakukan dengan metoda ELISA kit dan imunohistokimia. Metoda ELISA dapat dilakukan dengan metoda spektroskopi dengan mempergunakan Kit. Dari masing-masing marker yang akan dianalisis.

4.2.1 Analisis Aktivitas Enzim SOD

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Kubo (2002) dan Wijeratne (2005) dengan sedikit modifikasi. Metode ini digunakan untuk mengukur aktivitas menangkap radikal anion superoksida. Anion superoksida dihasilkan secara enzimatis oleh sistem xantin-xantin oksidase. Sebanyak 0.06 ml plasma darah direaksikan dengan campuran yang terdiri dari 2.70 ml bufer Natrium-karbonat yang mengandung 0.1mM EDTA (pH 10), 0.06 ml xantin 10 mM, 0.03 *bovine serum albumin* (BSA) 0.5%, 0.03 ml NBT 2.5 mM. Selanjutnya dilakukan penambahan xantin oksidase (0.04 units). Absorbansi yang dihasilkan setelah 30 menit diukur pada panjang gelombang 560 nm. Sebagai kontrol digunakan larutan yang dipakai dalam preparasi sampel hati yaitu PBS yang mengandung 11.5 g/L KCl dan *SOD Assay Kit Biovision*.

4.2.2 Analisis Aktivitas Enzim Katalase (CAT)

Pengukuran dilakukan dengan mengikuti prosedur Iwai, (2002). Aktivitas katalase diukur berdasarkan besarnya reduksi hidrogen peroksida. Dalam kuvet kuarsa, sebanyak 0.5 plasma darah ditambahkan ke dalam 2.0 ml bufer kalium fosfat (pH 7.0) yang mengandung 10 mM hidrogen peroksida. Perubahan absorbansi pada 240 nm dicatat setiap 15 detik selama satu menit. Selanjutnya dibuat kurva regresi larutan standar *CAT Assay Kit Biovision*.

4.2.3 Analisis Aktivitas Enzim Glutation Peroksida (GPx)

Sebanyak 200 ul ditambahkan 200 ul buffer fosfat 0.1 M pH 7.0 yang mengandung 0.1 mM EDTA, 200 ul glutation tereduksi (GSH), 10 mM dan 200 ul enzim glutation reduktase. Kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37°C, ditambahkan 200 ul NADPH 1.5 mM dan diinkubasi lagi selama 3 menit pada suhu yang sama, ditambahkan 200 ul H₂O₂ 1.5 mM. Absorbansi diukur diantara waktu satu sampai dua menit dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 340 nm.

4.2.4 Analisis Kadar 8-OHdG

Analisis kadar 8-OHdG mempergunakan instrumen Spektrofotometri UV-Vis dengan *8-OHdG DNA Damage ELISA Kit Cell Biolabs* dengan tahap-tahap sebagai berikut :

Siapkan semua reagen sebelum digunakan. Sampel yang akan diperiksa dan standar diuji dua kali. Tambahkan 50 µL sampel yang akan diperiksa dan standar 8-OHdG ke dalam sumur *8-OHdG Conjugated coated plate*. Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.

Tambahkan 50 μL anti 8-OHdG, inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Cuci *microwell strips* sebanyak 3 kali dengan 250 μL *wash Buffer* pada setiap sumur. Setelah dicuci, kosongkan / bersihkan sumur agar bersih dari *wash buffer*. Tambahkan 100 μL *Secondary Antibody – Enzyme Conjugate* ke dalam semua sumur. Inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Cuci *microwell strips* sebanyak 3 kali dengan 250 μL *wash Buffer* pada setiap sumur. Setelah dicuci, kosongkan / bersihkan sumur agar bersih dari *wash buffer*. Hangatkan *Substrate Solution* pada suhu kamar. Tambahkan 100 μL *Substrate Solution* ke dalam masing-masing sumur termasuk dalam sumur blanko. Inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Stop reaksi enzim dengan menambahkan 100 μL *Stop Solution* ke dalam masing-masing sumur termasuk sumur blanko. Perhatikan warna masing-masing sumur. Baca Absorbansi masing-masing *microwell* dengan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 450 nm.

Pemeriksaan kadar 8-OHdG dapat dilakukan dengan tahap-tahap sebagai berikut :

1. Siapkan semua reagen sebelum digunakan. Sampel yang akan diperiksa dan standar diuji dua kali.
2. Tambahkan 50 μL sampel yang akan diperiksa dan standar 8-OHdG ke dalam sumur 8-OHdG *Conjugated coated plate*. Inkubasi pada suhu kamar selama 10 menit.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blk	S1	S1	1	1	1	9	9	9	17	17	17
B	Blk	S2	S2	2	2	2	10	10	10	18	18	18
C	NSB	S3	S3	3	3	3	11	11	11	19	19	19
D	NSB	S4	S4	4	4	4	12	12	12	20	20	20
E	B ₀	S5	S5	5	5	5	13	13	13	21	21	21
F	B ₀	S6	S6	6	6	6	14	14	14	22	22	22
G	B ₀	S7	S7	7	7	7	15	15	15	23	23	23
H	TA	S8	S8	8	8	8	16	16	16	24	24	24

Blk - Blank
 TA - Total Activity
 NSB - Non-Specific Binding
 B₀ - Maximum Binding
 S1-S8 - Standards 1-8
 1-24 - Samples

3. Tambahkan 50 μL anti 8-OHdG, inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam.
4. Cuci *microwell strips* sebanyak 3 kali dengan 250 μL *wash Buffer* pada setiap sumur. Setelah dicuci, kosongkan / bersihkan sumur agar bersih dari *wash buffer*.
5. Tambahkan 100 μL *Secondary Antibody – Enzyme Conjugate* ke dalam semua sumur. Inkubasi pada suhu kamar selama 1 jam

6. Cuci *microwell strips* sebanyak 3 kali dengan 250 μ L *wash Buffer* pada setiap sumur. Setelah dicuci, kosongkan / bersihkan sumur agar bersih dari *wash buffer*.
7. Hangatkan *Substrate Solution* pada suhu kamar. Tambahkan 100 μ L *Substrate Solution* ke dalam masing-masing sumur termasuk dalam sumur blanko. Inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit.
8. Stop reaksi enzim dengan menambahkan 100 μ L *Stop Solution* ke dalam masing-masing sumur termasuk sumur blanko. Perhatikan warna masing-masing sumur

Well	EIA Buffer	Standard/ Sample	Tracer	Antibody
Blk	-	-	-	-
TA	-	-	5 μ l (at devl. step)	-
NSB	100 μ l	-	50 μ l	-
B ₀	50 μ l	-	50 μ l	50 μ l
Std/Sample	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l

9. Baca Absorbansi masing-masing *microwell* dengan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 450 nm.

4.2.5 Analisis Kadar MDA

Preparasi sampel dari darah dilakukan mengikuti Singh dkk. (2002). Sebanyak 0.5 ml plasma darah ditambah 2.0 ml HCl dingin (0.25 N) yang mengandung 15% TCA, 0.38% TBA dan 0.5% BHT. Campuran dipanaskan 80°C selama satu jam. Setelah dingin, campuran disentrifus selama 10 menit. Absorbansi serum/plasma diukur pada 532 nm. Sebagai larutan standar digunakan larutan Tetraetoksipropana atau standar *MDA Assay Kit* (Wuryastuti, 2000 ; Jamil, 2010 ; Mudasir, 2011).

Metoda di atas mempergunakan sampel darah, kalau mempergunakan jaringan hati maka Analisis Aktivitas SOD Hati Tikus hati dipreparasi terlebih dahulu selanjutnya dipergunakan reagen-reagen kit sesuai dengan manual yang ada di atas atau manual yang ada pada kit seperti yang ditunjukkan dalam contoh pengukuran aktivitas SOD pada hati tikus berikut ini :

Sebanyak 400 µl larutan kloroform/ etanol dingin 37,5/62.5 (v/v) ditambahkan ke dalam 150 µl lisat hati. Kemudian divorteks selama tiga detik dan disentrifus pada kecepatan 4400 rpm suhu 4°C selama 10 menit. Sebanyak 2,9 ml larutan A (campuran larutan xantin dan larutan sitokrom c) ditambah 50 µl larutan baku (kontrol) atau sampel dan divorteks secara perlahan. Reaksi dimulai dengan menam-bahkan 50 µl larutan B (xantin oksidase) dan divorteks secara perlahan. Pengamatan terhadap perubahan absorban yang terjadi dilakukan dengan spektrofotometer (Chen et al., 1996).

4.3. Pemeriksaan dengan metoda Imunohistokimia

Imunohistokimia adalah metode untuk mendeteksi protein di dalam sel suatu jaringan dengan menggunakan prinsip pengikatan antara antibodi dan antigen pada jaringan hidup. Pengecatan imunohistokimia banyak digunakan pada pemeriksaan sel abnormal seperti sel kanker. Molekul spesifik akan mewarnai sel-sel tertentu seperti sel yang membelah atau sel yang mati sehingga dapat dibedakan dari sel normal. Pemeriksaan ini membutuhkan jaringan dengan jumlah dan ketebalan yang bervariasi tergantung dari tujuan pemeriksaan. Umumnya jaringan yang berasal dari tubuh akan dipotong menjadi potongan yang sangat tipis dengan menggunakan alat yang disebut *vibrating microtome*.

Reaksi kimiawi ditandai adanya reaksi antara enzim dan substrat yang sifatnya spesifik karena bahan yang dideteksi akan direaksikan dengan antibodi yang spesifik yang dilabel dengan suatu enzim. Enzim yang biasanya sering digunakan untuk melabel antibodi tersebut dapat berupa enzim peroksidase, alkali fosfatase dan β-galaktosidase. Apabila antibodi yang dilabel dengan peroksidase maka substrat yang digunakan adalah peroksidase, apabila antibodi yang dilabel dengan alkalifosfatase maka substrat yang digunakan adalah alkalifosfat dan apabila antibodi yang dilabel dengan β-galaktosidase maka substrat yang digunakan adalah β-galaktosa. Untuk menandai adanya suatu reaksi enzimatis maka digunakanlah suatu indikator warna (*chromogen*) seperti α-naftol (berwarna biru) dan DAB (3,3-diaminobenzidine) berwarna coklat.

Beberapa contoh imunohistokimia yang banyak digunakan antara lain :

- *Carcinoembryonic Antigen (CEA)* mengidentifikasi *adenocarcinoma*. Sifat kurang spesifik.
- *Cytokeratins* mengidentifikasi carcinoma, namun dapat pula member hasil positif pada kasus sarcoma.
- CD 15 dan CD 30 digunakan untuk penyakit *Hodgkin*

- *Alpha Fetoprotein* untuk tumor *yolk sac* dan kanker sel hati
- CD 117 (KIT) untuk tumor *gastrointestinal stromal*
- *Prostate Spesific Antigen (PSA)* untuk kanker prostat
- Estrogen dan progesteron mendeteksi sel tumor
- CD 20 mengidentifikasi limfoma sel B
- CD 3 mengidentifikasi limfoma sel T
- DAB dalam mengidentifikasi fibrosarkoma tikus
- Pemeriksaan antioksidan enzimatik (endogen) seperti SOD

Pemeriksaan dalam hal ini mempergunakan reaksi-reaksi imun yang terjadi dan selanjutnya diperiksa dengan mikroskop dengan pembesaran 400x, seperti yang ditunjukkan oleh contoh dalam menentukan Cu dan Zn-SOD berikut ini :

4.4 Deteksi Imunohistokimia terhadap Cu, Zn-SOD.

Jaringan hati difiksasi selama 24 jam dalam larutan Bouin, dan selanjutnya diproses dengan metode standar menggunakan paraffin. Pewarnaan imunohisto-kimia pada preparat jaringan hati terhadap Cu,Zn-SOD dilakukan sesuai dengan metode yang dijabarkan Dobashi et al. (1989) dengan sedikit modifikasi. Setelah dilakukan inaktivasi terhadap peroksidase endogen, potongan jaringan diinkubasi dalam antibodi monoklonal anti-Cu,Zn-SOD (Sigma S2147) dan dilanjutkan dengan inkubasi dalam antibodi sekunder (Dako K1491). Produk reaksi antigen-antibodi divisualisasi dengan penambahan diamino benzidine (DAB). Profil antioksidan Cu,Zn-SOD pada jaringan hati tersebut diamati berdasarkan distribusi dan frekuensi antioksi dan tersebut pada jaringan hati. Pengamatan dilakukan secara kualitatif pada sitoplasma dan inti sel hati, serta dihitung secara kuantitatif pada inti sel hati berdasarkan intensitas warna coklat yang terbentuk. Intensitas warna coklat tersebut menunjukkan kandungan Cu,Zn-SOD, makin tua warnanya dan makin meratanya produk reaksi menunjukkan makin banyak kandungan Cu,Zn-SODnya. Pengamatan kuantitatif dilakukan terhadap inti sel tubuli renalis yang memberikan reaksi positif pada berbagai tingkat kandungan terhadap Cu,Zn-SOD (coklat tua atau positif kuat/+++ , coklat sedang atau positif sedang/++ , dan coklat muda campur biru atau positif lemah/ + , dan warna biru atau negatif/-). Penghitungan inti sel-sel tersebut dilakukan 5 lapang pandang pada pembesaran 400x yang dipilih secara acak. Perbedaan jenis SOD atau jenis logam yang ikut dalam SOD dapat dilakukan dengan metoda Atomic Adsorption Spectroscopi (AAS) atau Spektroskopi Serapan Atom (SSA).

DAFTAR PUSTAKA

- Aicha, N. Ines, I. Ines, B. Mohamed, B.S. Jamila, H.S. Jemni, B.C. Mohamed, N. Daniel, B. Leila, G. dan Kamel, G. 2006. A Comparative Evaluation of Mutagenic, Antimutagenic and Scavenging Radicals Activity of Essential Oil from *Pituranthos Chloranthus*. *SIPAM* 362-71.
- Akhlaghi, M., Brian, B. 2009. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia–reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 46 : 309–17.
- Almey, A., Khan, A.J., Zahir S., Suleiman M., Aisyah Rahim K., 2010. Total phenolic content and primary antioxidant activity of methanolic and ethanolic extract of aromatic plants' leaves. *International Food Research Journal*. 17 : 1077-88.
- Amarowicz, R., Naczka, M., and Shahidi F., 2000. Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls, *JAOCs*. 77 : 957-61.
- Anonim. 2012. Mengetahui Radikal Bebas dan Tipsnya, <http://mrsupel.blogspot.com/2012/06/mengetahui-radikal-bebas-dan-tipsnya.html>, diakses tanggal 3 Oktober 2012
- Ardiansyah. 2007. Antioksidan dan Peranannya bagi Kesehatan. <http://www.beritaiptek.com>, diakses pada tanggal 8 Januari 2009.
- Arise R.O., Malomo, S.O., Adebayo, J.O. and Igunnu, A. 2009. Effects of Aqueous Extract of *Eucalyptus globulus* on Lipid Peroxidation and Selected Enzymes of Rat Liver. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3(2) : 77-81.
- Arsana, 2014. Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dan Pelatihan Fisik menurunkan Stress Oksidatif pada Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Selama Aktivitas Fisik Maksimal. (*Disertasi*). Denpasar : Universitas Udayana.
- Birt, D. F., Hendrich, S. and Wang, W. 2001. Dietary Agents in Cancer Prevention: Flavonoids and Isoflavonoids. *Pharmacol. Ther.* 90 (2-3): 157–77.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun M. and Corke, H. 2004. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds of 112 Traditional Chinese Medicinal Plants Associated with Anticancer. *Life Science* 74(17) : 2157 – 84.
- Cappellini, M.D. and Fiorelli, G. 2008. Glucosa-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Lancet* 371: 64-74.
- Chevion, S., Molan, D.S., Heled Y. 2003. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. *PNAS*. 100(9):5119-23
- Chabowska, S.A., Beck, A., R.Poreba, Andrzejak, R. J. Antonowicz Juchniewicz. 2009. Evaluation of DNA Damage in People Occupationally Exposed to Arsenik and Some Heavy Metals. *Polish J. of Environ. Study*. 18 (6) : 1131-39.
- CITES, 2004. Annotated. CITES appendices and reservations.
- Cooke, M.S. and Mark D. E. 2007. 8-oxo-deoxyguanosin : Reduce, reuse, recycle. *PNAS*. Vol.124 (34) : 13535-1536.
- Dharmadasa, R.M., Siriwardana, A., Samarasinghe, K., Adhihetty P. 2013. Standardization of *Gyrinops walla* Gaertn (Thymalaeaceae) : Newly Discovered, Fragrant Industrial Potential, Endemic Plant from Sri Langka. *Word Journal of Agricultural Research*, Vol. 1 (6) : 101-3.
- Fessenden and Fessenden. 1986. *Kimia Organik*, edisi-3 (A.H. Pudjatkama). Erlangga. Jakarta.
- Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J. Cell. Biol.* 194(1) : 7-15.
- Forlenza, J.M. and Miller, G.E., 2006. Increased Serum Levels of 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine in Clinical Depression. *Psychosomatic*. 68 : 1-7.

- Franch PC., Belles, V.V., Codoner, A.A. and Iglesias, E.A., 2011. Oxidant mechanisms in childhood obesity : the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*. 158 : 369-84.
- Gill, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B. and Kader, A.A. 2002, Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from =’mnCalifornia, *J. Agric. Food Chem.* 50 (17) , pp. 4976-82.
- Goodsell D., 2007. Molecule of the Month: Superoxide Dismutase. http://www.rcsb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb94_1.htm, diakses tanggal 27 Oktober 2012.
- Grassi D.,Giovambattista Desideri and Claudio Ferri. 2010. Flavonoids : Antioxidants Against Atherosclerosis. *Nutrients*. 2 : 889-902.
- Gupta S., Lucky Sekhon, Yesul Kim and Ashok Agarwal. 2010. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. *Current Women’s Health Reviews*, 6, hal. 227-38.
- Hakim IA, Harris RB, Brown S. Effect of tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: a randomized controlled study. *J Nutr.* 2003; 133:3303S-9S.
- Hamid AA.,Aiyelaagbe, O.O., Usman, L.A., Ameen, O.M. and Lawal, A. 2010. Antioxidants : Its medicinal and pharmacological applications. *African J. of Pure and Applied Chemistry*. 4(8):142-51.
- Harborne, J.B, 1996. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. (Kosasih Padmawinata). ITB. Bandung.
- Harmita dan Radji, M., 2008, Buku Ajar Analisis Hayati, Edisi 3, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Horakova L. 2011. Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. *Interdiscip Toxicol*. 4(3):114-24.
- Indriati, A.,Widjanarko, S.B. dan Rakhmadiono, S. 2002. Analisis Aktivitas Antioksidan Pada Buah Jambu Mete (*Anacardium occidentale L.*), *BIOSAINS*, 2(1) : 12-17.
- Inoue, M. 2001. Protective Mekanism Against Reactive Oxygen Species in Arias IM The Liver Biology and Pathobiology. Lippincott Williams and Wilkins. 4th ed. Philadelphia.pp. 281-90.
- Jamil, D.O., 2010. Pelacakan Aktivitas Antikanker Terhadap Tiga Senyawa Santon Terprenilasi dari Spesies *Garcini*. (Skripsi). Jurusan Kimia FMIPA ITS Surabaya.
- Jawi, I.M.,Suprpta, D.N. dan Subawa, A.A.N. 2008. Ubi Jalar Ungu Menurunkan Kadar MDA dalam Darah dan Hati Mencit setelah Aktivitas Fisik Maksimal.*Jurnal Veteriner* 9 (2) : 65-72.
- Jawi I. M. 2013. Ekstrak Air Umbi Ubi Jalar Ungu Meningkatkan Ekspresi SOD dan menurunkan VCAM-1 Endotel Aorta Kelinci Yang Diberikan Pakan Standar atau Pakan Tinggi Kolesterol. (Disertasi). Denpasar. Universitas Udayana.
- Jena, NR. 2012. DNA damage by reactive species : Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37(3) : 503-17.
- Jiang M.Z., Yan H., Wen Y., Li X.M. 2011. In vitro and in vivo studies of antioxidant activities of flavonoids from *Adiantum capillus-veneris L.* *African Journal of Pharmacology Vol. 5(18)*. pp. 2079-85. China.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K.and Taniguchi H. 2002. Antioxidants Properties of Ferulic Acid and Its Related Compound. *J. Agric. Food Chem.* 50(8) : 2161-68. Japan.

- Kanazawa K., Uehara M., Yanagitani H., Hashimoto T. 2006. Bioavailable flavonoid to suppress the formation of 8-OHdG in HepG2 cell. 455 (2) : 197-203. Japan.
- Klopotek, Y., Otto, K. and Bohm V. 2005. Processing Strawberries to Different Products Alters Contents of Vitamin C, Total Phenolics, Total Anthocyanins, and Antioxidant Capacity. *J. Agric. Food Chem.* 53 (14) : 5640 – 46.
- Kobayashi, H., Wang, C. and Pomper, K.W., 2008. Phenolic Content and Antioxidant Capacity of Pawpaw Fruit (*Asimina triloba* L.) at Different Ripening Stages. *Hort Science* 43 (1) : 268 - 70. Japan
- Kubola, J. and Siriamornpun, S. 2008. Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L) Leaf, Stem and Fruit Fraction Extract in vitro. *Food Chemistry* 110(4) : 881-90. Thailand.
- Kumar, S. Kumar, D., Manjusha, Saroha, K., Singh, N. dan Vashishta, B. 2008., Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharmacology* 58 : 215–20. India.
- Kunwar, A. and Priyadarsini K.I.. 2011. Free Radicals, oxidatives stress and importance of antioksidansi in human health. *J,Med Allied Sci.* 1(2): 53-60. India.
- Landvik, S.V., Diplock A.T. and Packer, L. 2002. *Efficacy of Vitamin E in Human Health and Disease.* In : Cadenas, E. and L. Packer. 2002. Handbook of Antioxidants. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Lecumberri E., Goya, L., Mateos, R., Alfa, M., Ramos, R., Izquierdo-Pulido M. and L. Bravo. 2007. A Diet Rich in Dietary Fiber from Cocoa Improves Lipid Profile and Reduces Malondialdehyde in Hypercholesterolemic Rats. *Nutrition* 23 : 332-41.
- Maryam S. 2010. Tempe Reduced DNA Damage in Rats Irradiated With UV Ray. *Ejournal.* Denpasar. Udayana University.
- Marciniak A., Brzezczynska, J., Gwozdziński K. and Jegier A., 2009. Antioxidant Capacity and Physical Exercise, *Biology of Sport.* 26(3) : 197-213.
- Mc. Cord J.M., Fridovich I. 2006. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocytin). *J. Biol Chem.* 244(22):6049-55.
- Middleton Jr.E., Kandaswami C. and Theoharides T.C. 2000. The Effect of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implication for Inflammation Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Review.* 52 : 673-751.
- Mega, I.M., Swastini, D.A.. 2010. Screening Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal bebas Ekstrak Metanol Batang Gaharu (*Gyrinops versteegii*). *J. Kimia* 4 (2). Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Udayana. Denpasar.
- Mermelstein, N. 2009. Determining Antioxidant Activity. *Food Technology.* <http://www.ft.org>. Diakses pada Tanggal 23 Maret 2009.
- Montgomery, D.C. 2001. *Design and Analysis of Experiments.* 5th ed. John Wiley and Sons, Inc., New York
- Morsy A.F.M., Ibrahim H.S. and Shalaby, M.A. 2010. Protective Effect of Broccoli and Red Cabbage Against Hepatocellular Carcinoma Induced by N-Nitrosodietethylamine in Rats. *Journal of American Science* 6 (12) : 1136-44..
- Mudasir, A. Azis, A., Punagi, Q. 2011. Analisis Kadar MDA Plasma Penderita Polip Hidung Berdasarkan Dominasi Sel Inflamasi Pada Pemeriksaan Histopatologi. Bagian Ilmu Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok – Kepala Leher Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar. Diakses Tanggal 25 Oktober 2012.
- Mulyadi P. 2012. Penelusuran Senyawa Antioksidan pada Ekstrak Daun Gaharu (*Gyrinops versteegii*) dengan Metoda DPPH (Difenilpicril Hidrazil). (Skripsi). Denpasar. Universitas Udayana

- Murray R. K., Granner D.K., Rodwell V.W., 2009. *Biokimia Harper*, (Andri Hartono)..Edisi 27.Penerbit Buku Kedokteran, EGC. Jakarta.
- Ngatidjan, 2006, *Metoda Laboratorium dalam Toksikologi, Bagian Farmakologi dan Toksikologi FK UGM Yogyakarta*.
- Nausheen, Q.N., Ali, S.A., Subur, K. 2014. Cardioprotective and Antioxidant activity of Onion (*Allium cepa*) Leaves Extract in Doxorubicin Induced Cardiotoxicity in Rats. *Annals of Experimental Biology*. 2(2):37-42. India.
- Padayatty, S.J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P.K., Song, J., Koh, W.S. and Levine, M. 2002. Vitamin C: From Molecular Actions to Optimim Intake. In : Cadenas, E. dan L. Packer. 2002. *Handbook of Antioxidants*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Phusrisom S., Chatuphonprasert W., Monthakantirat O., Pearaksa P., Jarukamjorn K. 2013. *Alternanthera sessilis* and *Alternanthera bettzickiana* Improved Superoxide Dismutase and Catalase Activities in the Livers of Ovariectomized Mice. *Journal of Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*. 1.64-71. Thailand.
- Praveen, K., Ramamoorthy, Bono, A. 2007. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of *Morinda citrifolia*. Fruit Extracts From Various Extraction Processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. Vol. 2 (1) : 70 – 80
- Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K. 2005. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolic in Food and Dietary Supplement. *J. Agric. Food Chem*. 53(10) : 4290-4302.
- Priyanto, H.S. 2010. Toksikologi. Mekanisme, Terapi Antidotum dan Penelaian Risiko. Leskonfi. Depok Jawa Barat.
- Prakash, A. 2001, “ Antioxidant Activity “ Medallion Laboratories : Analithycal Progress, 19 (2) : 1 – 4.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M. and Ahmad, N. 2007. Dose Translation from Animal to Human Studies Revisited. *The FASEB Journal Life Sciences Forum*. 22(-) : 659-661.
- Rohman A., Sugeng R. dan Utari, 2006. Antioxidant Activities, Total Phenolic and Flavonoid Contens of Ethyl Acetate Extract of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Fruit and Its Fractions, *Majalah Farmasi Indonesia*. 17 (3) : 136-42.
- Ridwan E. 2013. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan, *J.Indon.Med*. 63 (3) : 112-16.
- Sadikin, 2002. *Biokimia Enzim*. Cetakan I. Penerbit Widya Medika. Jakarta.
- Sasaki, M., dan Joh, T. 2007. Oxidative Stress and Ischemia Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant Protective Agents. Diakses Tanggal 5 Nopember 2012.
- Shafie, 2011, Hubungan Radikal Bebas dan Antioksidan Terhadap Penyakit Periodontal, Skripsi, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Sumatra Utara, Medan. diakses tanggal 27 Oktober 2012.
- Sibuea, P., 2003. Antioksidan Senyawa Ajaib Penangkal Penuaan Dini. Sinar Harapan, Yogyakarta.
- Singh, R.P., Murthy, K.N.C. and Jayaprakasha, G.K. 2002. Studies on The Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punica granatum*) Peel and Seed Extracts using In Vitro Models. *J. Agric. Food Chem*. 50 (1): 81-6.
- Siswonoto S. 2008.”Hubungan Kadar MDA Plasma dengan Keluaran Klinis Stroke Iskemik Akut. (Thesis). Semarang : Universitas Diponegoro.
- Sugiono, 2011. *Statistika untuk Penelitian*. Penerbit Alfabeta. Bandung.

- Sugianto N.L., 2011. Pemberian Jus Delima Merah (*Punica granatum*) Dapat Meningkatkan Kadar Glutation Peroksidase Darah Pada Mencit (*Mus musculus*) dengan Aktivitas Fisik Maksimal. (Thesis). Denpasar. Universitas Udayana.
- Sumarna, Y. 2002. Budidaya Gaharu. Swadaya.Jakarta.
- Szymonik L.S., Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Słomka M, Madro A, Celiński K, Wielosz M. 2003. Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *J.Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2003, 10(4) : 309-15.
- Tarigan, 2004. Profil Budidaya Gaharu. Departemen Kehutanan, Pusat Bina Penyuluhan Kehutanan Jakarta.
- Tokur, B., Korkmaz, K. and Ayas, D. 2006. Comparison of Two Tiobarbituric Acid (TBA) Method for Monitoring Lipid Oxidation in Fish. *J. Fisheries and Aquatic Sci* 23(3-4) : 331-34.
- Valko, M., Mario I., Milan M.,Christopher J.R. and Joshua T. 2004. *Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.* Molecular and Cellular Biochemistry.266 : 36-37
- Vasudevan DM. and Sreekumari S. 2004. *Textbook of Biochemistry for Medical Student.* Jaypee. 4thed. p. 338-40.
- Widowati W. 2007. Peran antioksidan sebagai agen hipokolesterolemia pencegah oksidasi lipid dan aterosklerosis. *Majalah Kedokteran Domianus.*Volume 6 No 3. hal 227–35. FK Atmajaya Jakarta.
- Wiratno. 2009. *Pengaruh Polifenol Teh Hijau Terhadap Sistem Imun Penderita Karsinoma Nasofaring yang Mendapat Radioterapi Kajian jumlah monosit, limfosit serta produksi TNF- α , IFN- γ dan IL-2 ex vivo.* Media Medika Indonesia. 43 (4) : 175-81
- Wolfe, K., Kang, X., He, X., Dong, M., Zhang,Q. and Liu, R.H. 2008. Cellular Antioxidant Activity of Common Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 56 (18) : 8418-6426.
- Wolfe, K.L. and Liu., R.H. 2007. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.* 55 (22) : 8896-8907.
- Wrasati, L.P. 2011. Karakteristik dan Toksisitas Ekstrak Bubuk Simplisia Bunga Kamboja Cendana (*Plumeria alba*) dan Peranannya Dalam Meningkatkan Aktivitas Antioksidan Enzimatis pada Tikus *Sprague dawley* (Disertasi). Denpasar. Universitas Udayana.
- Wresdiyati, T., Astawan, M., Fithriani, Adnyane, I.K.M., Novelina, S. dan Aryani, S. 2010. Pengaruh α -Tokoferol Terhadap Profil Superoksida Dismutase dan Malondialdehida pada Jaringan Hati Tikus di Bawah Kondisi Stres. *Jurnal Veteriner.* Diakses tanggal 30 Oktober 2012.
- Wuryastuti, H. 2000. The Influence of Dietary Protein and Fats on Plasma Lipid in Sprague Dawley Rats. *Indonesian Food and Progress.* 7(2) : 37-41. Yogyakarta.
- Xu, H.C. and Wang, M.Y. 2014. Effect of flavonoid from Lotus (*Nelumbo nuficera* Gaertn) leaf on biochemical parameters related to oxidative stress induced by exhaustive swimming exercise of mice. *Biomedical Research.* 25 (1) : 1-5. China.
- You G.R.,Xu,X.R., Song, F.L., and Li, H.B. 2010. Antioxidant Activity and Total Phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *J. of Medicinal Plants Research* Vol.4 (22) : 2436-44.

- Yong, Lv., Yue J., Guozhu H., Ping pan and Nan Li. 2007. Comparative Study on Protective Effects of Tea Polyphenols and Vitamin C against Chemically Induced Hepatotoxicity in Mice. *Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics* 7(3) : 227-32.
- Zainuri M., Septelia Inawati Wanandi. 2012. Aktivitas Spesifik MnSOD dan Katalase pada hati Tikus yang diinduksi hipoksia sistemik : hubungannya dengan kerusakan oksidatif. *Media Litbang Kesehatan*. 22(2). Kemenkes RI. Jakarta.
- Zheng W. and Wang S.Y., 2009. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J.Agric.Food Chem.*, 49 (11) : 5165-70, ACS Publications, Washington D.C.
- Zou, Y., Lu, Y. and Wei,D. 2004. Antioxidant activity of Flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J. Agric. Food Chem.*,52 : 5032-39.
- Zou, Y., Lu, Y. and Wei, D. 2005. Hypocholesterolemic Effects of a Flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in Rats Fed a Cholesterol-Rich Diet. *J. Agric. Food Chem.*,53 : 2462-66.