

LAPORAN HASIL PENELITIAN

Isolasi Senyawa Antioksidan dan Antidiabetes dari Biji Kacang Koro (*Mucuna pruriens*)

PROGRAM INSENTIF RISET DASAR



030/PEN/43/01

Fokus Bidang : Kesehatan dan Obat-obatan

Tim Peneliti
Ir. Ch. Retnaningsih, MP
Dr. Ir. Wahyu Widowati, M.Si
Dr. Ir. Lindayani, MP

UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA
Jl. Pawiyatan Luhur IV/1, Bendan Dhuwur
Semarang-50234
Telp.024.8441555, Faks. 024.8445265
e-mail: nik@unika.ac.id
Nopember 2007

Keterangan Umum

Judul Penelitian : **Isolasi Senyawa Antioksidan dan Antidiabetes dari Biji Kacang Koro (*Mucuna pruriens*)**
Fokus Bidang Penelitian : Teknologi kesehatan dan obat-obatan
Lokasi penelitian : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Soegijapranata Semarang

Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian

A. Lembaga Pelaksana Penelitian

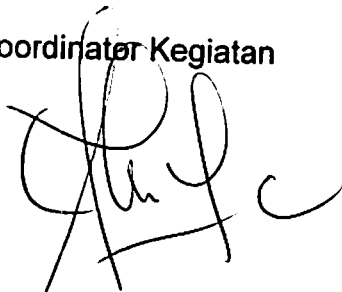
Nama Koordinator/Peneliti Utama : Ir. Ch Retnaningsih, MP
Nama Lembaga/Institusi : Universitas Katolik Soegijapranata
Unit Organisasi : Fakultas Teknologi Pertanian
Alamat : Jl. Pawiyatan Luhur IV/1, Bendan Dhuwur Semarang
Telepon/ Faksimile : 024-8441555/024-8445265
e-mail : nik@unika.ac.id

B. Lembaga lain yang terlibat

Nama koordinator : -
Nama Lembaga : -
Unit Organisasi : -
Alamat : -
Telepon : -


Semarang Nopember 2007

Koordinator Kegiatan



Ir. Ch. Retnaningsih, MP
058.1.1995.185

Kepala
Lembaga Penelitian dan
Pengabdian Masyarakat
Unika Soegijapranata



Jr. Djoko Suwarno, MT
058.1.1988.032

Ringkasan

Isolasi Senyawa Antioksidan dan Antidiabetes dari Biji Kacang Koro Benguk Rase (*Mucuna pruriens* L.) dan Biji Kacang Koro Glinding (*Phaseolus lunatus* L.)

Oleh :

Ch. Retnaningsih*, Wahyu Widowati**, Lindayani*

*Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata Semarang

**Pusat Studi Urban, Universitas Katolik Soegijapranata Semarang

**Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha Bandung

Penelitian dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.) dan biji kacang koro glinding atau juga disebut krotok (*Phaseolus lunatus* L.) sebagai antioksidan dan antidiabetes. Penelitian dibagi 3 tahap yaitu tahap pertama (tahun pertama) uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes secara *in vitro* dan uji fitokimia, tahap kedua (tahun kedua) uji aktivitas antidiabetes secara *in vitro* dan *in vivo* serta isolasi senyawa dari fraksi aktif antioksidan dan antidiabetes, tahap ketiga (tahun ke tiga) uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes secara *in vitro* dan *in vivo* senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antioksidan dan fraksi aktif antidiabetes.

Penelitian tahap pertama meliputi ekstraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % dan fraksinasi menggunakan pelarut n-hexan, etil asetat, butanol dan air, serta uji fitokimia dari ekstrak dan 4 fraksi untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding.

Penelitian ini diawali uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* ekstrak etanol biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding dengan parameter aktivitas pemerangkapan radikal kation superoksida atau nilai superoksida dismutase (SOD), pemerangkapan radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, (DPPH) pada 4 fraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding dengan parameter pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD), aktivitas katalase (CAT), nilai status antioksidan total (SAT). Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase lebih aktif dibanding ekstrak dan fraksi biji kacang koro glinding. Pengujian aktivitas antioksidan dilanjutkan pada fraksi biji kacang koro benguk rase yaitu aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal hidroksil (*OH) dan aktivitas katalase (CAT). Uji fitokimia pada ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding meliputi uji kualitatif kandungan golongan senyawa tanin, flavonoid, fenol, saponin, terpenoid, triterpenoid dan steroid.

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding menggunakan konsentrasi 125 µg/mL, 250 µg/mL dan 500 µg/mL dibandingkan dengan antioksidan, α-tokoferol, β-karoten, *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *butylated hydroxytoluen* (BHT).

Penelitian uji antidiabetes secara *in vitro* ekstrak etanol dan 4 fraksi dari biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding dengan parameter penghambatan α-glukosidase dengan konsentrasi 125 µg/mL, 250 µg/mL dan 500 µg/mL dibandingkan obat DM glucobay.

Hasil penelitian pada ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase menunjukkan bahwa aktivitas pemerangkapan radikal DPPH dari ekstrak biji kacang koro benguk rase konsentrasi 500 µg/ml sebesar 65,11 % lebih tinggi dibanding α-tokoferol, β-karoten tetapi lebih rendah dibanding BHA, ekstrak koro glinding dan BHT. Nilai SOD dari ekstrak biji kacang koro

benguk rase sebesar 382,7 unit/mL pada konsentrasi 500 µg/mL lebih tinggi dibanding ekstrak biji koro glinding, α-tokoferol, β-karoten, BHA tetapi lebih rendah dibanding BHT. Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat konsentrasi 500 µg/mL sebesar 93,23 %, nilai SOD tertinggi terdapat pada fraksi butanol konsentrasi 500 µg/mL sebesar 1278,2 unit/mL, , aktivitas katalase (CAT) tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat konsentrasi 500 µg/mL sebesar 66,3855 % dan fraksi butanol konsentrasi 500 µg/mL sebesar 35,9436 %. Nilai SAT tertinggi terdapat pada fraksi butanol biji kacang koro benguk rase konsentrasi 500 µg/mL yaitu sebesar 6,09 mml/L.

Hasil penelitian aktivitas antidiabetes paling tinggi adalah fraksi hexan konsentrasi 500 µg/mL biji kacang koro benguk rase yaitu sebesar 67,92 %

Rencana penelitian tahap ke dua meliputi uji antidiabetes secara *in vitro* menggunakan parameter adipogenesis pada ekstrak dan 4 fraksi biji kacang koro biji kacang koro benguk kacang koro glinding. Untuk mengetahui aktivitas fraksi aktif antioksidan, fraksi aktif antidiabetes yaitu penghambatan α-glukosidase dan penghambatan adipogenesis diuji secara *in vivo* pada tikus (*Rattus norvegicus* L) diabetic yang diinduksi alloxan. Dilanjutkan isolasi senyawa fraksi aktif antioksidan, fraksi aktif penghambatan α-glukosidase dan fraksi aktif anti adipogenesis untuk mendapatkan senyawa murni.

Kata kunci : antioksidan, anion superoksida, DPPH, katalase, status antioksidan total ,
Mucuna pruriens L, *Phaseolus lunatus* L.

Prakata

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas rahmatNya hingga penelitian dan laporan program Insentif Riset Dasar Tahun Anggaran 2007/2008 dapat diselesaikan.

Penelitian ini merupakan kajian aktivitas antioksidan,, antidiabetes yaitu penghambatan zim α -glukosidase, anti adipogenesis dari ekstrak dan 4 fraksi biji kacang koro (*Mucuna pruriens* L.) dan biji kacang koro glinding (*Phaseolus lunatus* L.).

Kacang koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.) dan kacang koro glinding atau disebut botok (*Phaseolus lunatus* L.) adalah tanaman tropis terdapat di Indonesia sampai saat ini digunakan sebagai makanan ternak karena mengandung senyawa toksik, dalam jumlah sangat kecil digunakan sebagai bahan pembuatan tempe benguk yang kurang diminati masyarakat. Penelitian ini bertujuan untuk menggali bioaktivitas khususnya aktivitas antioksidan, antidiabetes secara *in vitro* dan *in vivo* dalam mencegah penyakit diabetes mellitus (DM) yang dapat dalam biji kacang koro mengingat produksi kacang koro benguk rase dan koro glinding di Indonesia melimpah dan belum dimanfaatkan secara optimal serta memiliki nilai ekonomi yang sangat rendah. Diharapkan dari penelitian ini dapat meningkatkan nilai ekonomi serta pemanfaatan yang optimal biji kacang koro benguk rase sebagai tanaman obat yang dapat mencegah dan mengurangi aterosklerosis.

Berdasarkan penelitian secara *in vitro* menunjukkan bahwa biji kacang koro benguk rase sangat berpotensi sebagai antioksidan baik dari ekstrak kasar maupun fraksi terutama fraksi etanol dan fraksi etil asetat, hal ini ditunjang oleh hasil uji fitokimia yang menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi biji kacang koro mengandung golongan senyawa sumber antioksidan yaitu golongan fenol, flavonoid. Hasil rendemen ekstrak kacang koro sebesar 10,34 % cukup menjanjikan untuk dikembangkan sebagai sumber antioksidan. Untuk mengetahui aktivitas antidiabetes secara *in vitro* serta aktivitas fraksi aktif antioksidan dalam mempertahankan sistem antioksidan dan mengurangi DM secara *in vivo* serta isolasi senyawa dari fraksi aktif antioksidan, fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase dan fraksi aktif adipogenesis penelitian dilakukan pada tahun ke 2.

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih dan rasa hormat pada Kementerian Ristek dan Teknologi atas dana dan bimbingan yang telah diberikan. Pada kesempatan ini penulis mengharapkan dana program insentif riset dasar pada tahun ke 2 dapat dilanjutkan mengingat kacang koro benguk rase sangat berpotensi sebagai antioksidan secara *in vitro* perlu dilanjutkan penelitian secara *in vivo* pada tahun ke 2 untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam mencegah, mengurangi DM. Serta penelitian untuk mencari fraksi aktif biji

ancang koro sebagai anti adipogenesis atau uji resistensi insulin secara *in vitro* dalam mencegah DM

Terima kasih dan rasa hormat tim peneliti sampaikan kepada Kepala Lembaga Penelitian Universitas Katolik Soegijapranata Semarang yang telah memberikan pembinaan selama ini.

Akhirnya tim peneliti sampaikan ucapan terima kasih kepada para peneliti yang terlibat dalam penelitian ini. Kiranya penelitian ini dapat memberikan manfaat yang besar terhadap perkembangan ilmu di Indonesia serta dapat bermanfaat dalam pencegahan penyakit diabetes.

Semarang, November 2007

DAFTAR ISI

LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN.....	i
RINGKASAN	ii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
BAB II. TUJUAN DAN MANFAAT	7
2.1. Tujuan penelitian tahun I.....	7
2.2. Manfaat penelitian tahun I	7
BAB III. TINJAUAN PUSTAKA.....	12
3.1. Penyebab DM.....	12
3.2. Glikasi non-enzimatik dan glikooksidasi	13
3.3. Hubungan penyakit DM dan radikal bebas	15
3.4. Mekanisme verja penurunan kadar gula darah	18
3.5. Potensi antioksidan sebagai hipoglikemia	20
3.6. Etnobotani kacang koro	25
BAB IV. METODE PENELITIAN.....	28
4.1. Bahan dan alat penelitian.....	28
4.2. Tempat dan waktu penelitian	28
4.3. Tahap penelitian.....	29
4.4. Ekstraksi biji kacang koro.....	31
4.4.1. Destilasi etanol.....	31
4.4.2. Sortasi dan penggilingan biji kacang koro.....	31
4.4.3. Analisa proksimat biji kacang koro.....	31
4.4.4. Ekstraksi maserasi.....	31
4.4.5. Fraksionasi.....	32
4.4.6. Pembuatan pereaksi untuk uji fitokimia.....	33
4.5. Uji antioksidan ekstrak dan fraksi biji kacang koro.....	33
4.5.1. Prosedur Pengujian aktivitas pemerangkapan radikal anion superoksida (SOD).....	33
4.5.2. Prosedur uji antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl).....	35
4.5.3. Prosedur uji antioksidan katalase (CAT).....	35
4.5.4. Prosedur uji antioksidan pemerangkapan radikal *OH.....	36
4.5.5. Prosedur uji antioksidan status antioksidan total (SAT)	37
4.5.6. Prosedur uji antidiabetes inhibisi α -glukosidase	38
4.6. Uji fitokimia (modifikasi cara Farnsworth).....	38
4.6.1. Uji flavonoid.....	38
4.6.2. Uji fenol.....	39
4.6.3. Uji saponin.....	39
4.6.4. Uji triterpenoid dan steroid.....	39

4.6.5. Uji terpenoid.....	39
4.6.6. Uji tanin.....	39
4.6.7. Uji alkaloid.....	39
4.7 Diagram alir penelitian.....	40
4.7.1. Gambar bunga, daun dan biji kacang koro.....	40
4.7.2. Gambar diagram alir ekstraksi maserasi.....	41
4.7.3. Gambar diagram alir fraksionasi.....	42
4.7.4. Diagram alir uji pemerangkapan DPPH.....	43
4.7.5. Diagram alir uji pemerangkapan radikal anion superoksida.....	44
4.7.6. Diagram alir uji katalase.....	45
BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	46
5.1. Analisa proksimat biji kacang koro.....	46
5.2. Ekstraksi maserasi.....	47
5.3. Fraksionasi.....	48
5.4. Uji fitokimia.....	49
5.5. Aktivitas antioksidan.....	54
5.5.1. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH ekstrak biji kacang koro.....	54
5.5.2. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion superoksida ekstrak biji kacang koro.....	58
5.5.3. Aktivitas status antioksidan total (SAT) fraksi biji kacang koro	62
5.5.4. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD) fraksi biji kacang koro.....	66
5.5.5. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH fraksi biji kacang koro.....	71
5.5.6. Aktivitas antioksidan katalase (CAT) raksi biji kacang koro	74
5.5.7. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal *OH fraksi biji kacang koro	79
5.5.8. Aktivitas antidiabetes ekstrak dan fraksi biji kacang koro.....	83
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN.....	87
DAFTAR PUSTAKA.....	89
LAMPIRAN.....	93

DAFTAR TABEL

	Halaman
5.1 Hasil pengujian proksimat biji kacang koro.....	46
5.2 Hasil rendemen ekstraksi metode maserasi dari biji kacang koro.....	48
5.3 rendemen partisi cair-cair dari ekstrak biji kacang koro.....	49
5.4 Hasil uji fitokimia pada ekstrak dan fraksi biji kacang koro.....	50
5.5 Rataan dan UJBD jenis antioksidan ekstrak biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH.....	55
5.6 Rataan dan UJBD jenis antioksidan ekstrak biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap nilai SOD.....	59
5.7 Rataan dan UJBD jenis antioksidan ekstrak biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap nilai SAT.....	64
5.8 Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap nilai SOD.....	67
5.9 Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH.....	71
5.10 Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap aktivitas CAT.....	77
5.11 Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan *OH	80
5.12 Aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi biji kacang koro.....	82

DAFTAR GAMBAR

Halaman

3.1	Reaksi glikooksidasi	14
3.2	Metabolisme karbohidrat dan proses yang menyebabkan diabetes	16
3.4	Mekanisme stres oksidatif pada hiperglikemik	17
3.4	Hubungan diabetes dan hiperlipidemia dalam produksi radikal bebas OH	17
4.1	Skema penelitian ekstrak, fraksi, senyawa murni biji kacang koro	30
4.2	Skema fraksionasi biji kacang koro	32
4.3	Daun dan biji kacang koro glinding (<i>Phaseolus lunatus</i> L) dan koro benguk rase (<i>Mucuna pruriens</i> L.).....	40
4.4	Diagram alir pembuatan ekstrak biji kacang koro secara maserasi	41
4.5	Partisi cair-cair dari ekstrak biji kacang koro	42
4.6	Diagram alir uji DPPH.....	43
4.7	Diagram alir uji SOD.....	44
4.8	Diagram alir uji katalase.....	45
5.1	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, EBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH.....	57
5.2	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, EBKK terhadap nilai SOD.....	61
5.3	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FKKB, FKGG terhadap terhadap nilai SAT	66
5.4	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FKKB, FKGG terhadap terhadap nilai SOD	70
5.5	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH.....	73
5.6	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas CAT.....	78
5.7	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal *OH	81
5.8	Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antidiabetes ekstrak, fraksi Biji kacang koro	86

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
1 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (%) pada ekstrak kacang koro	93
2 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan SOD (unit/ml) pada ekstrak kacang koro	94
3 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan SAT (mmol/ml) pada fraksi kacang koro	95
4 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan SOD (unit/ml) pada fraksi kacang koro	97
5 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan SOD (unit/ml) pada fraksi kacang koro benguk rase	99
6 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (%) pada fraksi kacang koro	101
7 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan katalase (%) pada fraksi kacang koro benguk rase	103
8 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal *OH pada fraksi kacang koro benguk rase	105
9 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan SAT (mmol/ml) pada fraksi kacang koro benguk rase	107
10 Data sidik ragam dan uji jarak berganda (UJBD) hasil uji aktivitas penghambatan α -glukosidase (%) pada fraksi kacang koro	109
11 Hasil uji fitokimia pada biji kacang koro.	111

BAB I

PENDAHULUAN

Diabetes Mellitus (DM) adalah sindroma yang ditandai oleh gula darah yang tinggi (hiperglikemia) merupakan penyakit gangguan metabolisme karbohidrat akibat kekurangan insulin baik relatif maupun absolut yang akan menimbulkan glikosuria dan kemudian dapat diikuti gangguan metabolisme lemak, protein, elektrolit dan air. Gejala klasik yang menyertai penderita DM antara lain meliputi poliuria (banyak kencing), polidipsia (banyak minum) dan polifagia (banyak makan) namun badan cenderung mengurus, hiperglikemia, glikosuria, ketosis, asidosis dan koma. Gejala DM dapat dideteksi dari kadar glukosa darah pada manusia dalam status berpuasa lebih dari 120 mg/dl, sehingga manifestasi utama dari DM adalah hiperglikemia (Burtis *et al.*, 1988; Spector, 1989). DM adalah suatu keadaan hiperglikemia menahun yang akan mengenai seluruh sistem tubuh, disebabkan oleh adanya faktor yang dapat menghambat kerja insulin atau yang menyebabkan jumlah insulin menurun. Pada DM terdapat kelainan biokimiawi yang amat luas, namun ciri pokok yang mendasari semua abnormalitas yang lain adalah : 1). Berkurangnya jumlah glukosa yang masuk ke dalam berbagai jaringan perifer; 2). Bertambahnya jumlah glukosa yang dilepaskan dalam darah melalui glukoneogenesis. Sehingga timbul glukosa ekstrasel dan defisiensi glukosa intrasel keadaan ini disebut "kelaparan ditengah kelimpahan" (Ganong, 1993).

DM dibedakan atas DM tipe 1 (DM-1) atau *insulin-dependent diabetes mellitus* (IDDM) dan DM tipe 2 (DM-2) atau *noninsulin-dependent diabetes mellitus* (NIDDM). Pada DM-1 kerusakan pankreas berat, produksi insulin tidak ada atau minimal, sehingga mutlak memerlukan insulin dari luar tubuh. Maka DM-1 disebut juga DM tergantung insulin, DM-1 lazim timbul pada usia muda (anak-anak, remaja), tetapi kadang terjadi pada orang dewasa non-obesitas. Pada DM-1 terjadi gangguan katabolisme yang disebabkan karena hampir tidak terdapat insulin dalam sirkulasi, glukagon plasma meningkat, sel β pankreas gagal merespon semua stimulus insulogenik, sehingga diperlukan pemberian insulin eksogen untuk memperbaiki katabolisme, perlu tindakan pencegahan

ketosis dan menurunkan hiperglukagonemia dan menurunkan kadar glukosa darah (Katzung, 2002; Tiwari dan Rao, 2002).

Pada DM-2 terjadi kekurangan insulin, tetapi tidak seberat pada DM-1. Pada DM-2 selain kekurangan insulin disertai resistensi insulin yaitu adanya insulin tidak bisa mengatur kadar gula darah untuk keperluan tubuh secara optimal, sehingga ikut berperan terhadap meningkatnya kadar gula darah. DM-2 biasanya muncul setelah umur 30-40 tahun, bahkan timbul pada umur 50 atau 60 tahun kadang-kadang terjadi pada remaja. Sirkulasi insulin endogen cukup untuk mencegah terjadinya ketoasidosis tetapi insulin sering dalam kadar kurang dari normal atau secara relatif tidak mencukupi karena kurang pekannya jaringan. Obesitas pada umumnya menyebabkan gangguan kerja insulin, merupakan faktor resiko yang biasa terjadi pada DM-2, sebagian besar pasien DM-2 bertubuh gemuk. Pada DM-2 terjadi penurunan kepekaan jaringan pada insulin, terjadi defisiensi respon sel β pankreas terhadap glukosa. Resistensi jaringan terhadap insulin, kerusakan sel β terhadap glukosa dapat lebih parah pada hiperglikemia (Katzung, 2002).

Hasil penelitian menunjukkan tingkat kekerapan DM-1 sekitar 10 – 20% dan DM-2 adalah 80 - 90% dari seluruh penderita diabetes (Katzung, 2002; Tiwari dan Rao, 2002; Anonimus, 2005a; Anonimus, 2005b).

Kekurangan insulin secara relatif terjadi bila sirkulasi berlebihan hormon yang antagonis terhadap insulin ((glukagon, hormon pertumbuhan). Kekurangan insulin secara absolut terjadi saat degenerasi sel-sel pankreas penghasil insulin sehingga sintesa insulin tidak mencukupi untuk memenuhi kebutuhan tubuh (Katzung, 2002).

DM adalah penyakit metabolik yang jumlah penderitanya cenderung meningkat, rata-rata 1,5 – 2 % dari seluruh penduduk dunia menderita DM bersifat menurun, sedangkan di Eropa mencapai 3 – 5 % (Tjay dan Rahardja, 2003). Kurang lebih terdapat 14 juta orang Amerika Serikat menderita DM, paling sedikit 1,5 juta orang menderita DM tipe 1 (Katzung, 2002). Saat ini diduga secara global jumlah penderita DM sebesar 200 juta, hampir lima kali dibanding 10 tahun yang lalu, jumlah ini mungkin akan mengalami peningkatan dua kali lipat pada tahun 2030. Berdasarkan laporan *World Health Organization* (WHO) bahwa diabetes mellitus (DM) termasuk salah satu pembunuh terbesar di Asia tenggara dan Pasifik barat (Tiwari dan Rao, 2002). Menurut data WHO

jumlah penderita DM di Indonesia menempati urutan ke-6 di dunia setelah India, China, Rusia, Jepang dan Brasil yaitu pada tahun 1995 terdapat 4,5 – 5 juta penderita diabetes dan diperkirakan terjadi peningkatan sebanyak 230.000 pasien per tahun, sehingga mencapai 12 juta penderita DM pada tahun 2025. Jumlah penderita DM di Indonesia terus meningkat menjadi urutan keempat terbesar dunia dengan prevalensi 8,6 % dari total penduduk setelah India, China dan Amerika Serikat (PPI, 2005). Peningkatan DM di Indonesia terutama diakibatkan oleh pertumbuhan populasi peningkatan jumlah orang usia lanjut, pola makan dan gaya hidup yang tidak sehat, obesitas, dan gaya hidup sedentaris (kurang olahraga), (PPI, 2005, Anonimus, 2005a).

Penyakit DM menjadi sangat penting karena dapat mengakibatkan komplikasi yaitu komplikasi menahun, terutama didasari oleh kelainan vaskuler yaitu pembuluh darah kecil (mikroangiopati) dan pembuluh darah besar (makroangiopati). Manifestasi mikroangiopati terutama pada retinopati diabetik yang dapat mengakibatkan kebutaan, pada ginjal mengakibatkan nefropati diabetik akhirnya dapat mengakibatkan gagal ginjal. Makroangiopati dapat bermanifestasi di tungkai bawah mempermudah terjadinya *gangrene diabetic* yang mungkin memerlukan amputasi, dapat bermanifestasi di pembuluh darah menyebabkan penyakit jantung koroner (PJK) (Kariadi, 2001).

DM merupakan penyakit kronis dihubungkan dengan peningkatan *stres oksidatif* dan komplikasi vaskuler. Sebagai contoh kadar plasma lipid peroksida meningkat pada penderita DM dibandingkan orang normal dan pasien DM dan pasien DM-2 memiliki kadar plasma *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) lebih tinggi dibandingkan orang normal. DM berkaitan erat dengan gangguan metabolisme glukosa dan lipid (Halliwell & Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Sumber *stres oksidatif* pada diabetes diantaranya dikarenakan perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan diantaranya GSH (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Pemberian antioksidan berupa vitamin dapat mengurangi *stress oksidatif* bagi penderita DM-1 baik kronis maupun akut (Lee, 2002). Menurut Tiwari dan Rao (2002) sebagian besar antioksidan dalam plasma dapat berkurang pada

pasien DM-2 dikarenakan komplikasi diabetes yang menyebabkan berbagai komplikasi antara lain aterosklerosis dan penyakit jantung koroner. Antioksidan golongan fenol seperti *catechin* dan antioksidan sintetik *BHT (butylated hydroxy toluen)* dan *BHA (butylated hydroxyanisole)* dapat menghambat proses Maillard (Halliwell & Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Pemberian antioksidan dan komponen senyawa polifenol menunjukkan dapat menangkap radikal bebas, mengurangi *stress* oksidatif, menurunkan ekspresi *Tumour necrosis factor- α* (TNF- α). Senyawa fitokimia ternyata mampu memanipulasi dengan berbagai mekanisme sehingga dapat mengurangi komplikasi diabetes melalui pengurangan stres oksidatif, ROS dan TNF- α (Tiwari dan Rao; 2002).

Secara alami antioksidan yang terdapat pada daun sayuran, biji-bijian antara lain asam askorbat, vitamin E dan golongan fenol memiliki kemampuan mengurangi kerusakan oksidatif yang berkaitan dengan berbagai penyakit yaitu kanker, kardiovaskuler, katarak, aterosklerosis, diabetes, penuaan (Pieta *et al.*, 1998).

Biji kacang koro mengandung senyawa L-Dopa, alkaloid triptamin, lesitin dan tanin yang mempunyai aktivitas untuk menurunkan tekanan darah (*hypotensive agent*), menurunkan kadar gula darah (*hypoglycemic agent*). (Malhotra dan Singh, 2005).

Biji kacang koro mengandung senyawa bioaktif alkaloid mukunine, ,ukunadine, mukuadinine, pruriendine, nikotin, B-sitosterol, glutation, lesitin, asam venolat, asam galat. Kulit biji kacang koro mengandung senyawa bioaktif triptamin, alkilamin, steroid, flavonoid, koumarin, kardenolid (Vav Life Science, 2005).

.Ekstrak biji kacang koro konsentrasi 10 – 320 $\mu\text{g/mL}$ memiliki kemampuan aktivitas yang tinggi dalam penghambatan radikal anion superoksida (Superoksida dismutase : SOD) menyamai aktivitas antioksidan *quercetin*, ekstrak kacang koro konsentrasi 115 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai aktivitas pemerangkapan radikal H_2O_2 sebesar 50 %; konsentrasi 52,5 $\mu\text{g/mL}$ mempunyai aktivitas pemerangkapan radikal bebas nitrit oksida (NO) sebesar 50 % (Rajeshwar *et al.*, 2005).

I.1. Ruang lingkup dan batas-batas riset

Biji kacang koro mengandung yaitu 314,4 g/kg protein kasar, 51,6 g/kg serat kasar, 67,3 g/kg lemak kasar, 41,1 g/kg abu, 526,6 g/kg karbohidrat. Penyusun protein sebagian besar berupa valin, triptopan sedangkan sistin, metionin, leusin dalam jumlah rendah. Penyusun lemak sebagian besar adalah asam linoleat dan oleat sebesar 65,5 % dan asam lemak palmitat sebesar 20,16 % (Siddhuraju *et al.*, 1996). Rata-rata kadar potassium (K), fosfor (P) dan kalsium (Ca) lebih tinggi dibanding dengan jenis kacang-kacangan lainnya. Namun biji kacang koro juga memiliki kekurangan yaitu adanya *antinutritional factor* yaitu *antitryptic* dan *haemagglutinating activities* (Udedibie, dan Cartini, 1998).

Berdasarkan beberapa penelitian secara *in vitro* sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak biji kacang koro (*Mucuna pruriens* L.) mengandung beberapa senyawa bioaktif yang mempunyai aktivitas antidiabetes, ekstrak metanol biji kacang koro juga mempunyai aktivitas antioksidan, maka pada penelitian tahap pertama (tahun pertama) dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan secara *in vitro* dari ekstrak etanol dan fraksi dari 2 jenis biji kacang koro yaitu biji kacang koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L) dan koro glinding (*Phaseolus lunnatus* L.). Koro glinding adalah sebutan yang umum diberikan oleh petani Wonogiri pada kacang koro *Phaseolus lunatus* L (Lima bean), sedangkan di Indonesia secara umum disebut kacang Jawa atau kratok. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan meliputi parameter pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal anion superoksida (nilai SOD), pemerangkapan radikal hidroksil (*OH), aktivitas katalase (CAT), nilai status antioksidan total (SAT) dan pemerangkapan radikal *OH dan aktivitas antidiabetes secara *in vitro* menggunakan parameter penghambatan α -glukosidase dilanjutkan uji fitokimia untuk mengetahui golongan senyawa (alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, triterpenoid, steroid, tanin) yang terdapat pada ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding. Uji aktivitas antioksidan dari ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding dibandingkan antioksidan α -tokoferol, β -karoten, *butylated hydroxyanisole* (BHA) dan *butylated hydroxytoluen* (BHT) dan uji antidiabetes dibandingkan obat glucobay. Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes secara *in vitro*

ditentukan 1 fraksi aktif antioksidan dari ke 2 jenis biji kacang koro dan 1 fraksi aktif antidiabetes (penghambatan α -glukosidase) dari 2 jenis biji kacang koro.

Penelitian tahap kedua (tahun ke dua) meliputi uji aktivitas antidiabetes secara *in vitro* menggunakan parameter penghambatan adipogenesis dari ekstrak dan fraksi biji kacang koro bengkok rase dibandingkan tiazolidinedione selanjutnya ditetapkan fraksi aktif antidiabetes (penghambatan adipogenesis) dari ke 2 jenis biji kacang koro. Fraksi aktif hasil uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes secara *in vitro* diuji secara *in vivo* pada tikus diabetetik yang diinduksi *alloxan* menggunakan parameter antioksidan yaitu nilai SOD, CAT, GPx dan kadar MDA; parameter antidiabetes menggunakan parameter kadar gula darah dan gambaran histologis kerusakan sel β pada pulau langerhans pankreas. Uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes secara *in vivo* pada tikus dibandingkan dengan antioksidan α -tokoferol, dan dibandingkan dengan obat antidiabetes (penghambatan α -glukosidase) yaitu glucobay, obat antidiabetes (anti resistensi insulin yaitu tiazolidinedione). Fraksi aktif antioksidan dan antidiabetes tertinggi dari ke 2 jenis kacang koro kemudian diisolasi untuk memperoleh senyawa murni.

Penelitian tahap ke tiga (tahun ke tiga) meliputi uji aktivitas antioksidan dengan parameter aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal $\cdot\text{OH}$, aktivitas CAT, aktivitas antioksidan SAT, nilai SOD, dan antidiabetes penghambatan α -glukosidase serta aktivitas antidiabetes penghambatan adipogenesis secara *in vitro*. Berdasarkan uji *in vitro* senyawa murni ditentukan 1 senyawa murni yang mempunyai aktivitas antioksidan dan antidiabetes tertinggi untuk dilanjutkan uji *in vivo* pada tikus yang diinduksi *alloxan*. Menggunakan parameter antioksidan nilai SOD, CAT, GPx dan kadar MDA; parameter antidiabetes menggunakan parameter kadar gula darah dan gambaran histologis kerusakan sel β pada pulau langerhans pankreas. Uji aktivitas antioksidan dan antidiabetes senyawa murni secara *in vivo* pada tikus dibandingkan dengan antioksidan α -tokoferol, dan dibandingkan dengan obat antidiabetes penghambat α -glukosidase yaitu glibenclamid, obat antidiabetes resistensi insulin tiazolidinedione.

BAB II

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

Penelitian tahun pertama meliputi uji proksimat biji koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.) dan koro glinding (*Phaseolus lunatus* L), ekstraksi secara maserasi, partisi cair-cair untuk mendapatkan fraksi n-heksan, etil asetat, butanol dan fraksi air dari biji kacang koro benguk rase dan kacang koro glinding. Uji fitokimia pada ekstrak dan 4 fraksi untuk mengetahui kandungan golongan senyawa tanin, flavonoid, fenol, saponin, terpenoid, triterpenoid, steroid, alkaloid. Dilanjutkan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak dan 4 fraksi dengan parameter aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, nilai SOD, aktivitas status antioksidan total (SAT), aktivitas pemerangkapan radikal hidroksil (*OH), aktivitas katalase (CAT) serta uji aktivitas antidiabetes dengan parameter penghambatan α -glukosidase.

2.1. Tujuan penelitian

2.1.1. Tujuan penelitian tahun I

- 1). Mengetahui aktivitas antioksidan secara *in vitro* dari ekstrak etanol biji kacang koro benguk rase, koro glinding dibandingkan antioksidan α -tokoferol, β -karoten, BHA dan BHT menggunakan parameter pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD) dan aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH
- 2). Mengetahui aktivitas antioksidan secara *in vitro* dari fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding yaitu fraksi n-hexan, butanol, etil asetat dan fraksi air dibandingkan antioksidan α -tokoferol, β -karoten, BHA dan BHT menggunakan parameter nilai superoksida dismutase (SOD), nilai SAT status antioksidan total (SAT)
- 3). Mengetahui aktivitas antidiabetes penghambatan α -glukosidase dari ekstrak kasar dan 4 fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding
- 4). Menentukan golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak dan 4 fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding

- 5). Menentukan fraksi aktif antioksidan dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding berdasarkan uji antioksidan pemerangkapan DPPH, nilai SOD, nilai SAT
- 6). Menentukan fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding

2.1.2. Tujuan penelitian tahun II

- 1). Mengetahui aktivitas antidiabetes secara *in vitro* dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding menggunakan parameter penghambatan adipogenesis dibandingkan tiazolidinedione
- 2). Mengetahui aktivitas fraksi aktif antioksidan (berdasarkan hasil uji *in vitro*) sebagai antidiabetes melalui uji secara *in vivo* pada tikus (*Rattus novergicus* L.) yang diinduksi alloxan dengan parameter SOD, GPx, MDA, CAT, kadar gula darah, histopatologi sel β -pankreas
- 3). Mengetahui aktivitas fraksi aktif penghambatan α -glukosidase (berdasarkan hasil uji *in vitro*) sebagai antidiabetes melalui uji secara *in vivo* pada tikus (*Rattus novergicus* L.) yang diinduksi alloxan dengan parameter kadar gula darah
- 4). Mengetahui aktivitas fraksi aktif antiadipogenesis (berdasarkan hasil uji *in vitro*) sebagai antidiabetes melalui uji secara *in vivo* pada tikus (*Rattus novergicus* L.) yang diinduksi alloxan dengan parameter kadar gula darah
- 5). Mengetahui besarnya hubungan korelasi antara parameter antioksidan dan antidiabetes (penghambat α -glukosidase dan penghambat adipogenesis) pada hewan percobaan dalam mencegah dan mengurangi DM
- 6). Mengetahui senyawa murni yang berasal dari fraksi aktif antioksidan, fraksi aktif penghambat α -glukosidase, fraksi aktif penghambat adipogenesis

2.1.3. Tujuan penelitian tahun III

- 1). Mengetahui struktur kimia, nama kimia hasil isolasi fraksi aktif antioksidan
- 2). Mengetahui struktur kimia, nama kimia hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes

penghambatan α -glukosidase

- 3). Mengetahui struktur kimia, nama kimia hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis**
- 4). Mengetahui aktivitas antioksidan dengan parameter pemerangkapan radikal bebas DPPH, aktivitas pemerangkapan radikal $\cdot\text{OH}$, aktivitas CAT nilai SOD, nilai SAT, senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antioksidan**
- 5). Mengetahui aktivitas antidiabetes penghambatan α -glukosidase senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase**
- 6). Mengetahui aktivitas antidiabetes penghambatan adipogenesis senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis**

2.2. Manfaat penelitian

2.2.1. Manfaat penelitian tahun I

- 1). Mendapatkan fraksi aktif antioksidan dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding dengan parameter pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal bebas $\cdot\text{OH}$, nilai SOD, nilai SAT, aktivitas CAT**
- 2). Mendapatkan fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase dari biji biji kacang koro benguk rase dan koro glinding**
- 3). Mengetahui golongan senyawa yang terdapat pada ekstrak dan 4 fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding sehingga dapat diketahui penyusun fraksi aktif antioksidan yang berperan sebagai golongan senyawa antioksidan, diketahui penyusun fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase**

2.2.2. Manfaat penelitian tahun II

- 1). Mendapatkan fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding**

- 2). Mengetahui aktivitas fraksi aktif antioksidan (hasil uji secara *in vitro*) sebagai antioksidan dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus diabetik yang diinduksi alloxan secara
- 3). Mengetahui aktivitas fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus diabetik yang diinduksi alloxan
- 4). Mengetahui aktivitas fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus yang diinduksi alloxan
- 5). Mengetahui senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antioksidan
- 6). Mengetahui senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase
- 7). Mengetahui senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis

2.2.3. Manfaat penelitian tahun III

- 1). Mengetahui struktur, nama kimia senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antioksidan
- 2). Mengetahui struktur, nama kimia senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase
- 3). Mengetahui struktur, nama kimia senyawa murni hasil isolasi fraksi aktif antidiabetes penghambatan adipogenesis
- 4). Mengetahui aktivitas dan karakter senyawa murni antioksidan secara *in vitro*
- 5). Mengetahui aktivitas dan karakter senyawa murni antidiabetes penghambatan α -glukosidase secara *in vitro*
- 6). Mengetahui aktivitas dan karakter senyawa murni antidiabetes penghambatan adipogenesis secara *in vitro*
- 7). Mengetahui aktivitas senyawa murni antioksidan dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus diabetik

8). Mengetahui aktivitas senyawa murni antidiabetes penghambatan α -glukosidase dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus diabetik

9). Mengetahui aktivitas senyawa murni antidiabetes penghambatan adipogenesis dalam mengurangi DM secara *in vivo* pada tikus diabetik

Dengan selesainya serangkaian penelitian selama 3 tahun dapat diperoleh manfaat :

- 1). Memberikan sumbangan ilmiah yaitu dapat memberikan informasi ilmiah yang berguna tentang fraksi aktif dan senyawa murni aktif antioksidan, fraksi aktif dan senyawa murni aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase, antidiabetes penghambatan adipogenesis dalam menghambat, mengurangi DM yang berasal dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding yang memiliki nilai ekonomi rendah sehingga dapat dikembangkan sebagai sumber tanaman obat yang potensial
- 2). Memberikan sumbangan ilmiah yaitu dapat memberikan informasi ilmiah hubungan dan korelasi antara antioksidan, penghambatan α -glukosidase, penghambatan adipogenesis dalam menghambat, mengurangi DM dengan jumlah penderita yang terus meningkat

BAB III

TINJAUAN PUSTAKA

3.1. Penyebab DM

DM yang ditandai peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) dan ekskresi glukosa dalam urin yang disebabkan kegagalan produksi atau respon jaringan terhadap insulin

Diabetes Mellitus (DM) berkaitan erat dengan gangguan metabolisme glukosa dan lipid, merupakan penyakit kronis yang dihubungkan dengan peningkatan stres oksidatif dan komplikasi vaskuler. Sebagai contoh kadar plasma lipid peroksida meningkat pada penderita DM dibandingkan orang normal dan pasien DM. Pasien DM-2 memiliki kadar plasma *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) lebih tinggi dibandingkan orang normal. (Halliwell & Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Sumber stres oksidatif pada DM diantaranya dikarenakan perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS (*Reactive Oxygen Species*) dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan diantaranya GSH (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Menurut Bray *et al.* (2000) radikal bebas ROS terlibat patogenesis DM, ROS akan merusak sel- β pankreas, mengakibatkan penurunan perlindungan sistem antioksidan dalam sel- β pankreas. Antioksidan dalam sel- β pankreas meliputi superoksida desmutase (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx) mengalami penurunan pada penderita DM.

Stres oksidatif dan kerusakan oksidatif pada jaringan biasanya berakhir dengan timbulnya penyakit kronis diantaranya aterosklerosis, diabetes, rematik artritis. Terjadi peningkatan hasil glikosidasi dan liposidasi di dalam plasma dan jaringan protein dikarenakan meningkatnya stres oksidatif pada penderita DM (Anonimus, 2002). Bahan diabetonik diantaranya adalah *alloxan* dapat menyebabkan stres oksidatif pada sel β pankreas, demikian pula penderita DM sering mengalami stres oksidatif (Halliwell & Gutteridge, 1999; Bray *et al.*, 2000). Komplikasi diabetes berkaitan dengan stres oksidatif khususnya pembentukan radikal bebas superoksida (Mustafa *et al.*, 2005). Menurut Bray *et al.* (2000) *alloxan* sebagai pemicu DM pada hewan uji menghasilkan ROS berperan

penting dalam merusak sel- β pankreas sehingga mengganggu produksi insulin. Uji coba secara *in vitro* bahwa reduksi *alloxan* menyebabkan konsumsi O_2 meningkat dan menghasilkan radikal H_2O_2 . *Alloxan* atau *pyrimidine* bersifat tidak stabil mengalami reduksi menjadi asam dialurat yang bersifat toksik, asam dialurat akan mengalami autooksidasi menghasilkan radikal H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ dan $\cdot OH$.

DM merupakan penyakit kronis yang dihubungkan dengan peningkatan stres oksidatif dan komplikasi vaskuler. Sebagai contoh kadar plasma lipid peroksida meningkat pada penderita DM dibandingkan orang normal dan pasien DM-1 dan pasien DM-2 memiliki kadar plasma *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) lebih tinggi dibandingkan orang normal. DM berkaitan erat dengan gangguan metabolisme glukosa dan lipid (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Antioksidan pemerangkap radikal bebas $\cdot OH$ dapat melindungi dan melawan *alloxan* pemicu DM pada hewan uji mencit (Heikkila *et al.*, 1976). Pada uji coba mencit menunjukkan bahwa pemberian terlebih dahulu antioksidan pemerangkap radikal bebas $\cdot OH$ dapat menghentikan pengaruh *alloxan* sebagai diabetonik, pemberian antioksidan SOD dapat mencegah diabetogenesis dari *alloxan* pada mencit, melindungi kerusakan sel- β pankreas yang disebabkan *alloxan*, demikian juga pemberian antioksidan pengkelat logam dapat mengurangi pengaruh *alloxan* (Bray *et al.*, 2000).

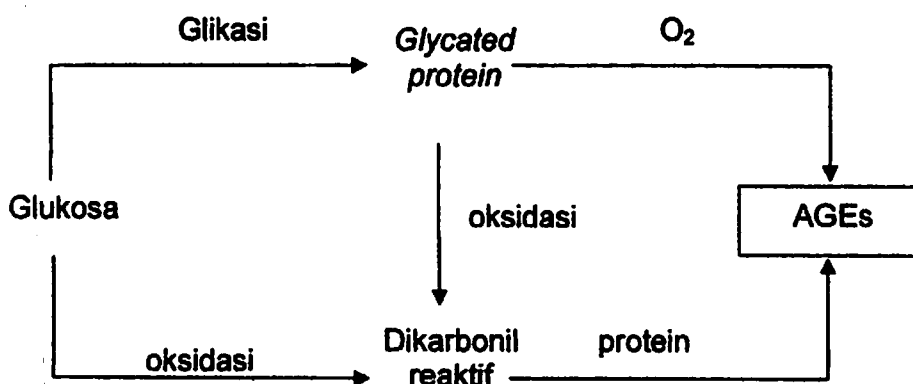
3.2. Glikasi non-enzimatik dan glikooksidasi

Glukosa dapat teroksidasi sebelum berikatan dengan protein demikian juga glukosa setelah berikatan dengan protein (*glycated protein*) dapat teroksidasi menghasilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS). Kombinasi glikasi dan oksidasi glukosa menghasilkan pembentukan AGEs (*advanced glycoen end-products*). Oleh karena itu ROS disebut *fixatives of glycation*. Akumulasi AGEs pada protein lebih lanjut diikuti dengan *browning*, peningkatan *fluorescence* dan *cross-linking*. Proses pembentukan AGEs merupakan proses *irreversible* yang berlangsung lama dan dapat menimbulkan kerusakan jaringan seperti tampak pada gambar 3.1. (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Pada penderita DM, AGEs juga dijumpai pada LDL dalam sirkulasi dan lesi aterosklerotik (*atherosclerotic lesion*). Pembentukan AGEs diduga berperan

dalam kerusakan endoteial sel (jejas endotel). Ikatan glukosa pada gugus amino LDL akan memfasilitasi oksidasi dan pembentukan aldehyd sitotoksin seperti 4-HNE yang dapat memodifikasi apoB. Produk-produk AGEs juga dapat terbentuk langsung pada apoB. Pembentukan AGEs cara lain dengan mengoksidasi glukosa kemudian produk oksidasi bereaksi dengan protein. Monosakarida dapat dioksidasi dan dikatalisis oleh ion Fe dan Cu menghasilkan $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $\cdot OH$ dan karbonil toksik yang dapat merusak protein, reaksi ini disebut *Maillard browning*. Struktur kimia AGEs meliputi *carboxymethyllysine* dan *pentosidine* suatu *fluorescent cross-link* residu lisin dan arginin dalam *AGEs modified protein*. Pada diabetes kadar *methylglyoxal* yang terbentuk dari intermediate glikolisis meningkat dan berperan dalam pembentukan AGEs (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Glycated protein dan *AGEs modified protein* dapat mengakibatkan stres oksidatif, keduanya dapat melepaskan $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 secara langsung dan dapat mengaktifkan fagosit. Berbagai sel seperti makrofag, monosit dan endotel mampu mengenal AGEs melalui *cell-surface receptor* (RAGE=*receptor for AGE*). Dalam keadaan normal RAGE menyebabkan makrofag mampu mengenali dan menelan sel-sel yang mengalami glikosilasi (*AGEs-modified erythrocytes*). RAGE juga ditemukan pada sel endotel, paparan AGE terhadap RAGE dapat mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B, aktivasi ini dapat menurunkan GSH. *AGEs modified protein* diduga mempengaruhi proliferasi pembuluh darah yang berlebihan pada retinopati diabetik (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

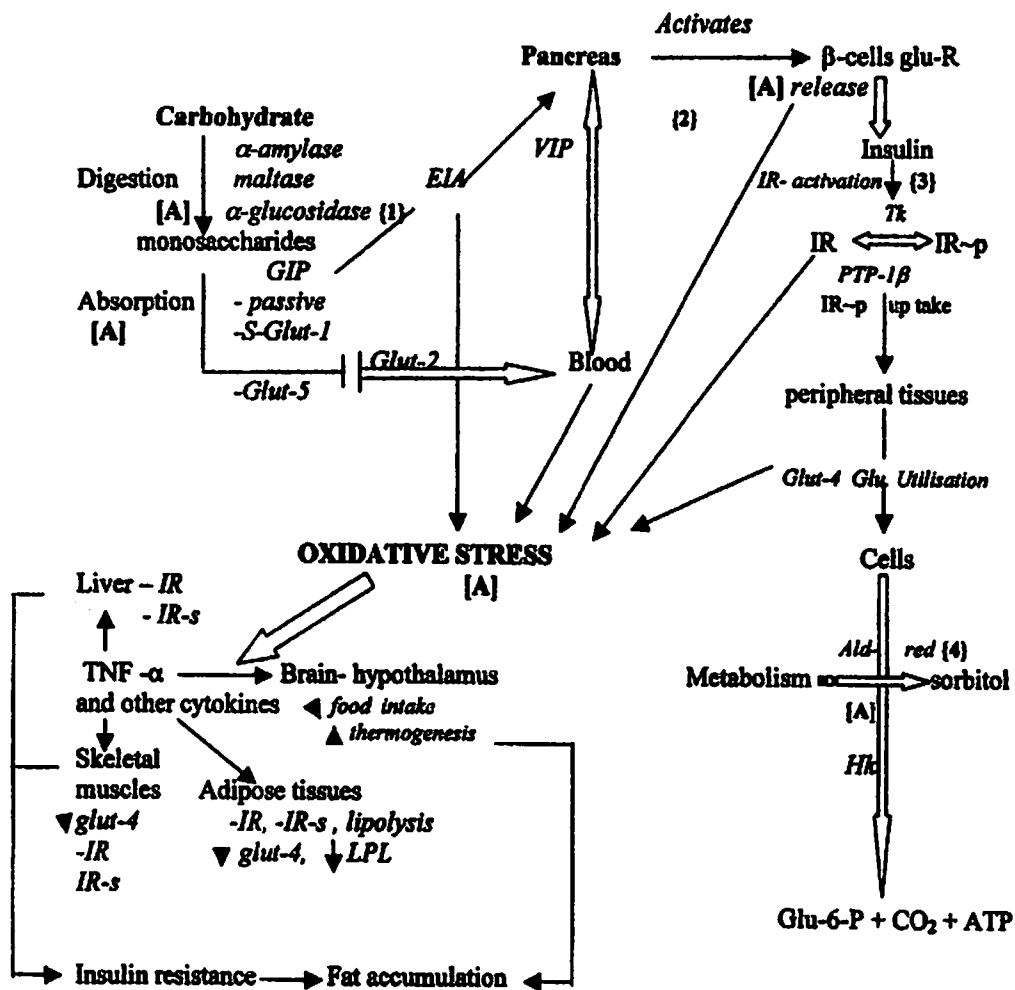


Gambar 3.1. Reaksi glikooksidasi (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

3.3. Hubungan penyakit DM dan radikal bebas

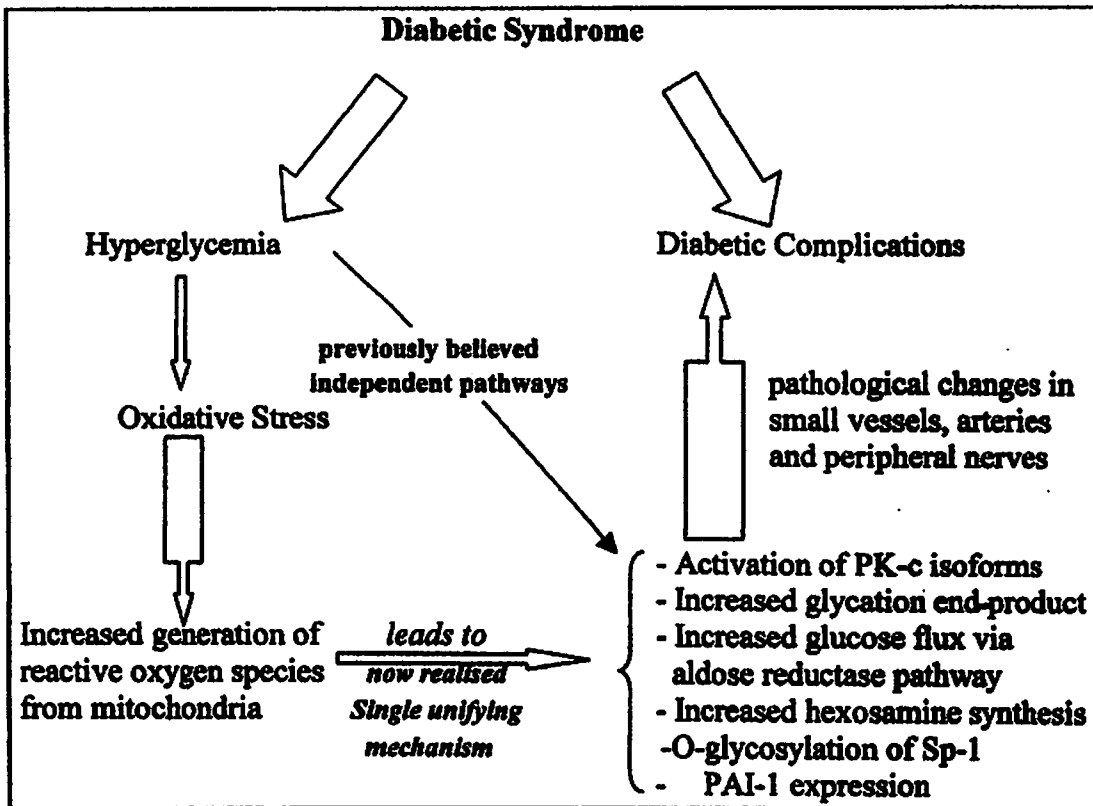
Sumber stres oksidatif pada diabetes berasal dari perpindahan keseimbangan reaksi redoks karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang akan meningkatkan pembentukan ROS dari reaksi glikasi dan oksidasi lipid sehingga menurunkan sistem pertahanan antioksidan (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Hiperglikemia akan memperburuk dan memperparah pembentukan ROS melalui beberapa mekanisme. ROS akan meningkatkan pembentukan ekspresi *Tumour necrosis factor- α* (TNF- α) dan memperparah stres oksidatif. TNF- α dapat mengakibatkan resistensi insulin melalui penurunan autofosforilasi (*autophosphorylation*) dari reseptor insulin, perubahan reseptor insulin substrat-1 menjadi *inhibitor insuline receptor tyrosine kinase activity*, penurunan *insuline-sensitive glucose transporter* (GLUT-4), meningkatkan sirkulasi asam lemak (*fatty acids*), merubah fungsi sel β , meningkatkan kadar trigliserida dan menurunkan kadar HDL. Hasil penelitian menunjukkan injeksi TNF pada hewan uji sehat akan menurunkan sensitifitas insulin yang diakibatkan karena hiperglikemia tanpa disertai penurunan kadar insulin plasma (Tiwari dan Rao, 2002).



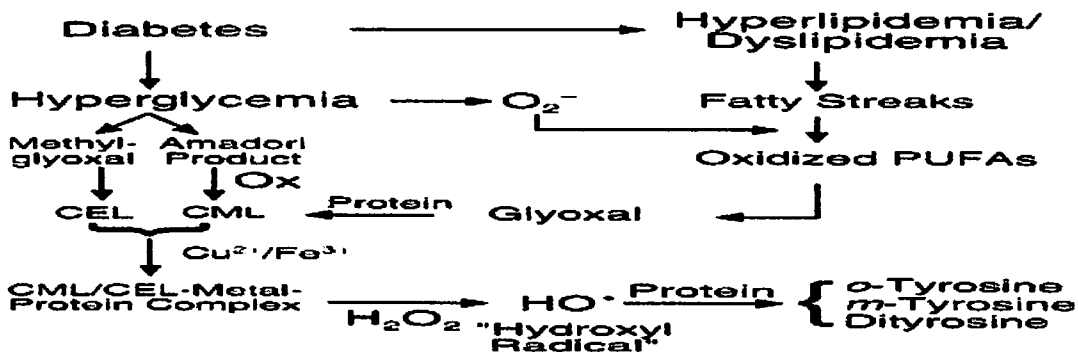
Gambar 3.2. Metabolisme karbohidrat dan proses yang menyebabkan timbulnya diabetes S-Glut-1: Sodium glucose co-transporter-1; GIP : gastrointestinal peptide; VIP : Vasoactive intestinal peptide; EIA : Entero-insular axis; glu-R: Glucose receptor; IR: Insulin receptor; IR-s : Insulin receptor substrate; Tk : Tyrosine kinase enzyme; PTP : Protein phosphotyrosin phosphatase; TNF : Tumour necrosis factor; Ald-Red : Aldose reductase; Hk: Hexokinase; LPL: Lipoprotein lipase (Tiwari dan Rao, 2002).

Menurut Tiwari dan Rao (2002) stres oksidatif pada penderita diabetes akan meningkatkan pembentukan ROS di dalam mitokondria yang akan mengakibatkan berbagai kerusakan oksidatif berupa komplikasi diabetes dan akan memperparah kondisi penderita diabetes, untuk itu perlu menormalkan kadar ROS di mitokondria untuk mencegah kerusakan oksidatif (Gambar 3.3).



Gambar 3.3. Mekanisme stres oksidatif pada hiperglikemik (Tiwari & Rao, 2002).

Menurut Anonimus (2001) hiperglisemia akan mengkatalisis pembentukan radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dari sumber mitokondria dan sitoplasma yang akan menyebabkan terjadinya lipoksidasi dan menghasilkan *glyoxal* merupakan prekursor *carboxymethyllysine* (CML). Penderita diabetes kadar *methylglyoxal* yang terbentuk dari *intermediate* glikolisis meningkat selanjutnya membentuk *carboxyethyllysine* (CEL). Baik CEL maupun CML akan berikatan dengan Cu atau Fe menghasilkan *CML/CL-metal-protein complex* (Gambar 3.4).



Gambar 3.4. Hubungan diabetes dan hiperlipidemia dalam produksi radikal bebas OH (Anonimus, 2001).

3.4.Mekanisme kerja penurunan kadar gula darah

Menurut Suryowinoto (2005) mekanisme kerja berbagai tanaman sebagai antidiabetes adalah : 1). Mempunyai kemampuan sebagai astringen yaitu dapat mempresipitasikan protein selaput lendir usus dan membentuk suatu lapisan yang melindungi usus, sehingga menghambat asupan glukosa sehingga laju peningkatan glukosa darah tidak terlalu tinggi. Beberapa tanaman yang termasuk dalam kelompok ini adalah : alpukat (*Persia americana* Mill.), buncis (*Phaseolus vulgaris*), jagung (*Zea may* L.), jambu biji (*Psidium guajava* L.), lamtoro atau kemlandingan (*Lecauna glauca sensu* Bth.), mahoni (*Swietenia mahagoni* Jacq.), salam (*Eugenia polyantha* Wight.); 2). Mempercepat keluarnya glukosa dari sirkulasi, dengan cara mempercepat peredaran darah yang erat kaitannya dengan kerja jantung dan dengan cara mempercepat filtrasi dan ekskresi ginjal sehingga produksi urin meningkat, laju ekskresi glukosa melalui ginjal meningkat sehingga kadar glukosa dalam darah menurun. Beberapa tanaman yang termasuk dalam kelompok ini adalah bawang putih (*Allium sativum* L.), daun sendok (*Plantago mayor* L.), duwet atau jamblang (*Eugenia cumini* L.), keji beling (*Strobilanthus crispus* L), kumis kucing (*Orthosiphon aristatus* L.), labu parang (*Cucurbita moschata* L.); 3). Mempercepat keluarnya glukosa melalui peningkatan metabolisme atau memasukan ke dalam deposit lemak. Proses ini melibatkan pankreas untuk memproduksi insulin. Beberapa tanaman yang termasuk kelompok ini adalah : lidah buaya (*Aloe vera* L.), brotowali (*Tinospora crispa* L.), pare (*Momordica charantia* L.), sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).

Hasil penelitian ekstrak kasar buncis (*Phaseolus vulgaris*) memberikan efek hipoglisemik pada kelinci diabetes yang diinduksi *alloxan* mampu menurunkan kadar glukosa darah sampai 30% (Andayani, 2000). Hasil penelitian pada tikus menunjukkan bahwa ekstrak daun sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) 0,5 g/kg bb, 1 g/kg bb dan 1,5 g/kg bb dapat menghambat kenaikan kadar glukosa (Suryadhana, 2000).

3.4.1. Penghambatan absorpsi glukosa

Metabolisme karbohidrat diawali pelepasan glukosa dan transportasi glukosa melintasi *brush border* usus menuju pembuluh darah merupakan target kontrol yang efektif terhadap *post prandial hiperglikemia* (PPHG). Berbagai

tanaman obat dilaporkan berpotensi untuk menghambat enzim yang menghidrolisis karbohidrat antara lain α -amilase dan α -glukosidase dan manipulasi transport glukosa. Kobayashi (2000) telah melakukan penapisan dari beberapa jenis tanaman mempunyai aktifitas menghambat α -amilase yang akhirnya juga mempunyai aktifitas mengurangi terhadap PPHG.

Senyawa polifenol yang mempunyai aktivitas antioksidan dilaporkan dapat menghambat α -amilase dan sukrase yang ternyata dapat menekan PPHG. Senyawa polifenol juga mampu menghambat transport glukosa melintasi usus melalui penghambatan *glucose co-transporter-1* (S-GLUT-1). Senyawa katesin, epikatesin, epigalokatesin, galat epikatesin, isoflavon dari ekstrak kedelai, senyawa polifenol, tanin, asam klorogenat, fraksi saponin dari *Gymnea sylvestre* dan senyawa saponin dari beberapa ekstrak tanaman ternyata mampu memanipulasi S-GLUT-1 sehingga menghambat transport glukosa dan mempunyai aktivitas antihiperqlikemia. Kemampuan memanipulasi S-GLUT-1, menghambat α -amilase, α -glukosidase dari senyawa polifenol merupakan alternatif untuk mencegah dan menghambat hiperqlikemia (Tiwari dan Rao, 2002).

Beberapa senyawa yang terkait saponin dari berbagai ekstrak tanaman mempunyai aktivitas hipoglikemia diantaranya adalah *3-O-glucuronic acid*, *28-ester glucoside*, *3-O-glucopyranosol*, *6'methyl ester* dari *glucuronic acid*. Aktifitas sebagai hipoglisemia melalui penghambatan dan penundaan transfer glukosa dari lambung menuju usus halus yang merupakan tempat utama absorpsi glukosa, penghambatan transport glukosa pada *brush border* usus. Senyawa yang terkait saponin ini dapat mengurangi PPHG melalui penghambatan absorpsi karbohidrat lebih sesuai bagi penderita DM-2 (Tiwari dan Rao, 2002).

Beberapa pendekatan untuk mengurangi dan menghambat *uptake* glukosa pada usus halus : 1). Penghambatan enzim pencernaan; 2). Penghambatan transport aktif glukosa melintasi *brush border* usus; 3). Penundaan laju pengosongan alat pencernaan (Tiwari dan Rao, 2002).

3.4.2. Regenerasi sel β dan aktivitas pelepasan insulin

Pemberian ekstrak kasar *Pterocarpus marsupium* (dikenal vijayar di India) dengan pelarut air dapat melindungi dan memperbaiki pengaruh *alloxan*

pemicu diabetes pada tikus, ternyata pada *Pterocarpus marsupium* ditemukan senyawa aktif epikatesin yang dapat mencegah dan memperbaiki sel- β dari pengaruh *alloxan* juga dibuktikan melalui kadar gula darah yang menunjukkan normal (Tiwari dan Rao, 2002). Tanaman obat *Gymnema sylvestre* asal India yang bernama gumar yang berarti perusak gula. Ekstrak tanaman ini dilaporkan mampu bersifat antidiabetes yaitu mampu mengurangi kebutuhan insulin melalui peningkatan ketersediaan insulin endogenous, mengembangkan kemampuan homeostasis gula darah, mengendalikan hiperlipidemia yang berkaitan dengan diabetes, mengurangi aktivitas amylase pada serum, meningkatkan fungsi sel- β . Ekstrak air-alkohol dari daun *Gymnema sylvestre* dilaporkan dapat melepaskan insulin dari sel- β pankreas baik pada hewan uji yang menderita hiperglikemia (Chakravarti *et al.*, 1996 dalam Tiwari dan Rao, 2002).

Ignacimuthu dan Amalraj (1998) melaporkan bahwa ekstrak daun dari tanaman *Zizyphus jujuba* terbukti mempunyai kemampuan antidiabetes dan antihiperlipidemia pada tikus yang diberi *alloxan* pemicu diabetes, hal ini dikarenakan kandungan alkaloid barberine yang mempunyai aktivitas hipoglikemik dan ternyata mempunyai kemampuan pula untuk melepaskan insulin dari sel- β pankreas.

Ekstrak biji *Trigonella foenum-graceum* L. (methiin sejenis tanaman di India) dilaporkan memiliki kemampuan hipoglikemia dan hipolipidemia pada hewan uji demikian juga pada manusia, hal ini dikarenakan kandungan senyawa antioksidan pada biji *Trigonella foenum-graceum* L. yang terbukti mampu memperbaiki kondisi pada mencit yang menderita diabetes (Ribes *et al.*, 1987; Ravikumar dan Anuradha, 1997 dalam Tiwari dan Rao, 2002).

Menurut Agrawal *et al.* (1996) bahwa ekstrak tanaman tulasi di India (*Ocimum sanctum* dan *Ocimum album*) dilaporkan dapat menurunkan kadar glukosa darah dan urin puasa dan *postprandrial* pada penderita DM-2.

3.5. Potensi antioksidan sebagai hipoglikemia

Menurut Bray *et al.* (2000) bahwa defisiensi Zn pada jaringan dan sel baik pada otot, sel darah dan plasma menyebabkan DM, sedangkan kadar Zn yang mencukupi dapat menyembuhkan penderita DM. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian insulin dapat meningkatkan kadar Zn plasma,

sehingga dapat mengurangi kadar glukosa darah. Zn merupakan komponen dari antioksidan Cu,Zn-SOD merupakan antioksidan utama dalam pertahanan terhadap ROS dengan cara memerangkap radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), sehingga defisiensi Zn pada hewan uji akan mengakibatkan stres oksidatif dibanding hewan uji yang memperoleh cukup Zn dalam diet. Hasil penelitian juga membuktikan bahwa *alloxan* melalui mekanisme ROS akan merusak sel- β yang dapat mengakibatkan timbulnya DM dan dapat dicegah dengan pemberian antioksidan Cu,Zn-SOD.

Kerusakan sel- β pankreas dapat dicegah dengan pemberian antioksidan pemerangkap radikal $\cdot OH$, antioksidan Cu,Zn-SOD, antioksidan pengkelat logam, antioksidan CAT (Bray *et al.*, 2000). Hal ini dikarenakan pada saat terjadi kerusakan sel- β pankreas karena pengaruh *alloxan* menyebabkan penurunan aktivitas antioksidan Cu,Zn-SOD, CAT, GPx (Grankvist *et al.*, 1981 dalam Bray *et al.*, 2000).

Pemberian antioksidan berupa vitamin dapat mengurangi stres oksidatif bagi penderita DM-1 baik kronis maupun akut (Lee, 2002). Menurut Tiwari dan Rao (2002) sebagian besar antioksidan dalam plasma dapat berkurang pada pasien DM-2 dikarenakan komplikasi diabetes yang menyebabkan berbagai komplikasi antara lain aterosklerosis dan penyakit jantung koroner.

Antioksidan vitamin bermanfaat untuk mengurangi kerusakan oksidatif pada penderita diabetes. Hasil penelitian di Turki menunjukkan pada tiga puluh penderita DM-2 ditemukan adanya ketidak seimbangan oksidan dan antioksidan dalam plasma penderita diabetes dibanding kontrol. Berdasarkan hasil penelitian *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) kadar vitamin A, vitamin E lebih rendah, tidak untuk konsentrasi vitamin C pada penderita diabetes dibanding kontrol. Pemberian vitamin C dosis tinggi 2 g/hari dapat memperbaiki kesehatan penderita diabetes (Steelsmith, 2001; Vaziri, 2005; Schoenhals, 2005).

Vitamin C membantu mencegah komplikasi DM-2 dengan penghambatan produksi sorbitol. Sorbitol adalah hasil sampingan dari metabolisme gula yang akan diakumulasikan di dalam sel dan berperan terhadap perkembangan neuropati dan katarak. Pemberian vitamin C 1000 - 3000 mg/hari pada penderita diabetes dapat mengurangi produksi sorbitol (Steelsmith, 2001). Dianjurkan bagi penderita diabetes untuk banyak

mengonsumsi makanan mengandung kandungan vitamin C cukup tinggi diantaranya adalah jeruk, jambu biji, cabe hijau, kecambah dan brokoli, karena konsumsi vitamin C dosis tinggi dapat mencegah berbagai komplikasi diabetes (Steelsmith, 2001).

Vitamin C, vitamin E, β -karoten, α -lipoic acid dan N-acetyl cysteine adalah sumber antioksidan yang banyak ditemukan pada buah dan sayuran segar, untuk itu penderita diabetes disarankan mengonsumsi sumber antioksidan sebagai tindakan terapi (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Steelsmith, 2001).

Antioksidan golongan fenol seperti catechin dan antioksidan sintetik BHT (butylated hydroxy toluen) dan BHA (butylated hydroxyanisole) dapat menghambat proses Maillard (Halliwell & Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Pemberian antioksidan dan komponen senyawa polifenol menunjukkan dapat memerangkap radikal bebas, mengurangi stres oksidatif, menurunkan ekspresi TNF- α . Senyawa fitokimia ternyata mampu memanipulasi dengan berbagai mekanisme sehingga dapat mengurangi komplikasi diabetes melalui pengurangan stres oksidatif, ROS dan TNF- α (Tiwari dan Rao, 2002).

Penelitian di Shiga-Jepang pemberian antioksidan vitamin E dapat memperbaiki komplikasi diabetes, memperbaiki fungsi ginjal (ren), menormalkan hipertensi pada hewan uji yang menderita DM-2 hal ini menunjukkan bahwa stres oksidatif berperan dalam perkembangan diabetes nefropati dan antioksidan sebagai terapeutik DM-2. Penelitian di Swedia menunjukkan bahwa pemberian α -tocopherol ternyata dapat mencegah diabetes dan melindungi gangguan ginjal pada hewan uji tikus. Pemberian diet yang kaya tocotrienol dapat menurunkan kadar glukosa darah dibanding pada hewan uji kontrol. Pemberian vitamin E setiap hari selama 4 bulan pada pasien ternyata dapat melindungi dari diabetes nefropati (Steelsmith, 2001; Schoenhals, 2005).

Terapi menggunakan antioksidan Coenzyme Q10 (CoQ10) bermanfaat bagi penderita DM tipe 2 melalui mekanisme memperbaiki fungsi mitokondria dalam sel pankreas sehingga memperbaiki produksi insulin. Pemberian CoQ10 selama 12 minggu pada 74 orang penderita DM-2 dapat menurunkan tekanan darah sistole dan diastole sehingga dalam jangka panjang dapat memberikan efek terhadap *glycemic control*. Penelitian yang lain pada penderita DM-2

ternyata pemberian CoQ10 dapat memperbaiki *glycemic control*, melindungi jantung dengan meningkatkan fungsi endothelial (Schoenhals, 2005).

Pemberian ALA (*alpha-lipoic acid*) pada tikus yang diinduksi diabetes menunjukkan bahwa ALA dapat meningkatkan aktivitas GPx pada ginjal, menormalisasi aktivitas superoksida dismutase (SOD) pada jantung serta dapat mengurangi *stress* oksidatif. Pemberian ALA secara intravena pada penderita diabetes neuropati dapat mengurangi gejala neuropati. Pemberian ALA dapat mencegah meningkatnya tekanan darah, resistensi insulin dan mampu mengontrol kadar gula darah (Schoenhals, 2005).

Pycnogenol adalah ekstrak batang tanaman pinus yang tumbuh pinggir laut Perancis sebagai tanaman obat untuk menyembuhkan luka mengandung 70 % *procyanidin*, asam fenolat, derivat asam benzoat, derivat asam sinamat sebagai *food supplement* tidak toksik, *non-allergenic*, *non mutagenic*. *Pycnogenol* sebagai antioksidan ternyata dapat mencegah komplikasi vaskuler diabetes, mencegah diabetes *retinopathy* dengan pemberian ekstrak *pycnogenol* 20-160 mg/hari (Hughes, 2003; Schoenhals, 2005). Pemberian ekstrak *Pycnogenol* secara signifikan dapat mengurangi kadar glukosa darah dan meningkatkan sistem antioksidan endogenous pada tikus diabetes (Hughes, 2003; Schoenhals, 2005).

Pemberian ekstrak *Gymnema sylvestre* pada mencit ternyata dapat memperbaiki fungsi insulin dan mengontrol kadar glukosa darah, pemberian ekstrak *Gymnema montanum* dapat mengurangi kadar glukosa darah dan meningkatkan kadar insulin plasma. Spesies *Gymnema* mempunyai aktivitas antioksidan dan *antihyperglykemiaf* (Schoenhals, 2005).

Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) mempunyai aktivitas *antihyperglycemic*, pemberian fenugreek setelah 15 hari dapat menurunkan 14,4 % kadar glukosa darah dan dapat menurunkan 46,6 % kadar glukosa darah setelah 30 hari pemberian. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa fenugreek pada DM-2 ternyata mampu memperbaiki *glycemic control* serta menurunkan *insuline resistance*. Fenugreek juga mampu meningkatkan/memperbaiki kesehatan dan kerja jantung dengan menurunkan kadar trigliserida, LDL, total kolesterol serta meningkatkan kadar HDL. Fenugreek ternyata juga mampu memperbaiki keseimbangan status antioksidan pada penderita diabetes (Anonimus, 2005c; Schoenhals, 2005).

Hasil penelitian di Hebrew University of Jerusalem hasil isolasi fraksi *fenugreek* menunjukkan aktivitas hipoglikemia dan hipokolesteromia baik pada hewan uji maupun manusia. Salah satu jenis fraksi *fenugreek* jenis asam amino adalah 4-hydroxyisoleucine (4-OH-Ile) yang mampu memperbaiki glucose-induced insulin response setelah diberikan secara intravena pada hewan uji penderita DM tipe 2. Setelah 6 hari pemberian fraksi 4-OH-Ile ternyata mampu mengurangi hiperglikemia dan insulinemia serta memperbaiki *glucose tolerance*. Penelitian di Pernacis menunjukkan bahwa pemberian fraksi 4-OH-Ile secara invitro mampu mengendalikan kadar glukosa darah melalui produksi insulin, hal ini dikarenakan 4-OH-Ile mampu merangsang sel β pankreas (Schoenhals, 2005).

Fraksi lain yang dapat diisolasi dari *fenugreek* adalah *galactomannan*, pemberian ekstrak *galactomannan* dengan nama FenuLife ternyata mampu menurunkan kadar glukosa darah yaitu pemberian 4 g/hari pada penderita DM-2 selama 8 minggu ternyata secara cepat dapat menurunkan kadar glukosa darah (Schoenhals, 2005).

Pemberian isoflavon dari ekstrak kacang kedelai 132 mg/hari selama 12 minggu secara signifikan dapat memperbaiki resistensi insulin (Schoenhals, 2005).

Konsumsi sayur dan buah-buahan yang mengandung kadar karotenoid tinggi dapat melindungi terhadap hiperglikemia, kadar lutein dan β -karotenoid plasma secara tidak langsung dapat menjaga kadar glukosa darah pada relawan yang sehat (Schoenhals, 2005).

Pemberian karotenoid, astaxanthin dapat menurunkan kadar glukosa darah non puasa pada hewan uji DM-2 (Schoenhals, 2005).

Karotenoid adalah pigmen tanaman yang larut lemak, sedangkan flavonoid adalah pigmen yang larut air. Ekstrak dari biji anggur mengandung sejumlah flavonoid yaitu *proanthocyanidin* dapat meningkatkan sensitifitas insulin serta mengurangi pembentukan radikal bebas. Pemberian flavonoid quercetin ternyata mampu menghambat perkembangan *diabetic cataract* (Schoenhals, 2005).

Pemberian antioksidan berupa vitamin dapat mengurangi stres oksidatif bagi penderita DM-1 baik kronis maupun akut (Lee, 2002). Menurut Tiwari dan Rao (2002) sebagian besar antioksidan dalam plasma dapat berkurang pada

pasien DM-2 dikarenakan komplikasi diabetes yang menyebabkan berbagai komplikasi antara lain aterosklerosis dan penyakit jantung koroner. Antioksidan golongan fenol seperti *catechin* dan antioksidan sintetik *BHT* (*butylated hydroxy toluen*) dan *BHA* (*butylated hydroxyanisole*) dapat menghambat proses Maillard (Halliwell & Gutteridge, 1999; Anonimus, 2000).

Pemberian antioksidan dan komponen senyawa polifenol menunjukkan dapat menangkap radikal bebas, mengurangi stres oksidatif, menurunkan ekspresi *Tumour necrosis factor- α* (TNF- α). Senyawa fitokimia ternyata mampu memanipulasi dengan berbagai mekanisme sehingga dapat mengurangi komplikasi diabetes melalui pengurangan stres oksidatif, ROS dan TNF- α (Tiwari dan Rao; 2002).

Secara alami antioksidan yang terdapat pada daun sayuran, biji-bijian antara lain asam askorbat, vitamin E dan golongan fenol memiliki kemampuan mengurangi kerusakan oksidatif yang berkaitan dengan berbagai penyakit yaitu kanker, kardiovaskuler, katarak, aterosklerosis, diabetes, penuaan (Pieta *et al.*, 1998).

3.6. Etnobotani kacang koro

Indonesia sebagai negara tropis dikenal sebagai mega biodeveritas ke dua sehingga memiliki sumber tanaman obat yang melimpah yaitu lebih 30.000 spesies tanaman dan kira-kira 1000 spesies dikenal sebagai tanaman obat yang potensial.

Penggunaan obat-obatan tradisional telah lama digunakan secara luas dan kecenderungan terus meningkat. Berdasarkan hasil survey nasional tahun 1999 penduduk Indonesia sebanyak 20,5% menggunakan obat tradisional sebagai pengobatan sendiri dan pada tahun 2001 meningkat menjadi 31,7%. Obat tradisional ini berupa obat yang diproduksi oleh industri atau dibuat sendiri atau hasil ramuan para tabib. Berdasarkan *National Agency of Drug and Food Control* ada tiga kelompok alasan masyarakat menggunakan obat tradisional yaitu untuk merawat/menjaga kesehatan, untuk mengobati penyakit dan mengurangi gejala penyakit, digunakan oleh penduduk pedesaan yang jauh dari fasilitas pengobatan.

Untuk itu perlu pengembangan obat asli Indonesia yang terjangkau oleh masyarakat yang diharapkan dapat mencegah berbagai penyakit yang

berperan menurunkan produktivitas masyarakat dan secara tidak langsung juga menyebabkan komplikasi berbagai penyakit yaitu hiperkolesteremia yang merupakan faktor resiko penyakit kardiovaskuler . Untuk mengurangi kasus penyakit kolesterol, kardiovaskuler perlu dicarikan bahan alami yang mempunyai keamanan tinggi dan mempunyai aktivitas antioksidan, antikolesterol. Senyawa antioksidan alami berupa flavonoid, bahan yang bersifat antikolesterol bahan yang mempunyai aktivitas memecah lemak tubuh antara lain berupa L-Dopa, bahan antioksidan diharapkan dapat mencegah oksidasi lipid khususnya LDL pada dinding arteri sehingga dapat mengurangi dan mencegah kasus penyakit kardiovaskuler. Bahan alami yang mengandung antioksidan dan L-Dopa serta melimpah di Indonesia dan belum dimanfaatkan secara optimal diantaranya adalah biji kacang koro (*Mucuna pruriens* L.)

Klasifikasi tanaman kacang koro (*Mucuna pruriens*) menurut Tjitrosoepomo (1996) divisi Spermatophyta, subdivisi Angiospermae, kelas Dicotyledoneae, bangsa Fabaceae, suku Fabaceae, genus *Mucuna*, spesies *Mucuna pruriens* L.

Tanaman kacang koro termasuk tanaman tahunan merambat, ketinggian dapat mencapai 3-18 m, tanaman ini merupakan tanaman asli daerah Afrika, India. Biji kacang koro mengandung protein, karbohidrat , lemak, serat dan mineral yang tinggi. Biji kacang koro mengandung 7 -10 % L-dopa. Kacang koro mengandung senyawa alkaloid, alkilamin, arakidat, asam behenat, betakarbolin, bufotenin, sistin, dopamin, asam lemak, asam galat, genistin, asam glutamat, glutation, glisin, histidin, isoleusin, L-dopa, asam linoleat, lisin, d-manosa, mukunadin, mukunin, asam miristat, niasin, nikotin, asam palmitat, asam palmitolik, fenilalanin, pruriendin, prurienin, riboflavin, saponin, serotinin, asam stearat, stizolamin, treonin, tirosin, valin (Taylor, 2005). Menurut Anonimus (2005b) biji kacang koro mengandung senyawa alkaloid *mucunine*, *mucunadine*, *mucuadinine*, *pruriendine* dan *nicotine*, *B-sitosterol*, *glutathione*, *lecithin*, *venolic* dan *gallic acids*, *tryptamine*, *alkylamines*, *steroids*, *flavonoids*, *coumarins*, *cardenolides* dan lain-lain.

Biji kacang koro mengandung 314,4 g/kg protein kasar, 51,6 g/kg serat kasar, 67,3 g/kg lemak kasar, 41,1 g/kg abu, 526,6 g/kg karbohidrat. Penyusun protein sebagian besar berupa valin, triptopan sedangkan sistin, metionin,

leusin dalam jumlah rendah. Penyusun lemak sebagian besar adalah asam linoleat dan oleat sebesar 65,5 % dan asam lemak palmitat sebesar 20,16 % (Siddhuraju *et al.*, 1996) Rata-rata kadar potassium (K), fosfor (P) dan kalsium (Ca) lebih tinggi dibanding dengan jenis kacang-kacangan lainnya. Namun biji kacang koro juga memiliki kekurangan yaitu adanya *antinutritional factor* yaitu *antitryptic* dan *haemagglutinating activities* (Udedibie, dan Cartini, 1998).

Biji kacang koro mengandung senyawa L-Dopa, alkaloid triptamin, lesitin dan tanin yang mempunyai aktivitas untuk menurunkan tekanan darah (*hypotensive agent*), menurunkan kadar gula darah (*hypoglycemic agent*). Alkaloid yang terdapat pada biji kacang koro antara lain mukanine, mukananine dan priridine (Malhotra dan Singh, 2005). Secara etnobotani kacang koro sangat bermanfaat yaitu di Brazil digunakan mengobati edema, cacing usus, diuretik; di Jerman kacang koro digunakan untuk mengobati penyakit diabetes, tekanan darah tinggi, kadar kolesterol tinggi, gas pada usus, nyeri otot, rematik dan cacing usus; di India kacang koro digunakan untuk mengobati kanker, kolera, diabetes, diarrhea, disentri, asam urat, batu ginjal, menstruasi tidak teratur, sedangkan di berbagai negara kacang koro digunakan untuk mengobati asthma, obat terbakar, kanker, kolera, obat batuk, diareha, diabetes, edema, parasit usus, paralisis dan lain-lain (Anonimus, 2005).

Klasifikasi kacang koro glinding (*Phaseolus lunatus* L.) divisi Spermatophyta, subdivisi Angiospermae, kelas Dicotyledoneae, bangsa Rosales, suku Leguminosae, genus *Phaseolus*, spesies *Phaseolus lunatus* L. (Tjitrosoepomo, 1996).

Tanaman koro glinding atau kacang emas atau krotok mempunyai ciri-ciri daun majemuk, lonjong, tersebar, tepi rata, ujung meruncing, berambut halus, pertulangan menyirip, panjang 5 – 11 cm. Batang kacang koro glinding tegak, bulat, berkayu, berambut pendek, warna hijau keputihan; berakar tunggang; berbunga majemuk, bentuk tandan di ketiak daun, kelopak bentuk lonceng, berbulu halus dan panjang 2 – 2,5 cm, warna hijau keputihan, mahkota berbentuk kupu-kupu, berambut halus; buah polong berisi 3 – 4 biji, panjang 3 – 5 cm, berwarna putih kehijauan, biji berbentuk ginjal, panjang sekitar 2 cm, lebar 1.5 cm berwarna coklat muda (Anonimus, 2007)

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan dan alat penelitian.

Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri biji kacang koro benguk rase dan koro glinding berasal dari Kecamatan Baturetno, Kabupaten Wonogiri, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan meliputi bahan uji untuk pemerangkapan radikal bebas 1,1-diphenyl 1-2- pycrylhydrazyl (DPPH) (Sigma) dan metanol PA, bahan uji pemerangkapan radikal bebas anion superoksida adalah Kit SOD RANDOX (RANSOD) terdiri 4 jenis reagen yaitu reagen 1 (mixed substrate), reagen 2 (buffer), reagen 3 (santin oksidase), reagen 4 (standar), KIT TAS (RANDOX) terdiri dari 4 reagen yaitu reagen 1 (buffer), reagen 2 (chromogen), reagen 3 (substrate), control TAS. Uji katalase (CAT) terdiri H_2O_2 dan bahan uji fitokimia adalah magnesium (Mg), HCl, amil alkohol, $FeCl_3$, asam asetat anhidrat, H_2SO_4 , vanilin. Antioksidan α -tokoferol, β -karoten, BHA, BHT. Uji pemerangkapan radikal OH terdiri dari PBS, DMSO, 2-deoksiribosa, EDTA, TCA, TBA, NaOH. Uji antidiabetes terdiri dari α -glucosidase (*Saccharomyces* sp), buffer fosfat, bovine serum albumine (WAKO), p-nitrophenyl α -D-glucopyranosida, Na_2CO_3

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah mesin pembuat serbuk, pisau, timbangan, kertas saring, ayakan berukuran 180 mesh, erlenmeyer, alat ekstraksi maserasi, *rotary vacuum evaporator*, beaker glass, timbangan analitik, pisau bedah, spuit, sokletasi, evaporator, tabung eppendorf, tabung vial 1 ml, evaporator, penangas air, mikro-pipet, stopwatch, thermometer, timbangan, spektrofotometer, corong, labu ukur, batang pengaduk, gelas piala, architect ci 8200.

4.2. Tempat dan waktu penelitian

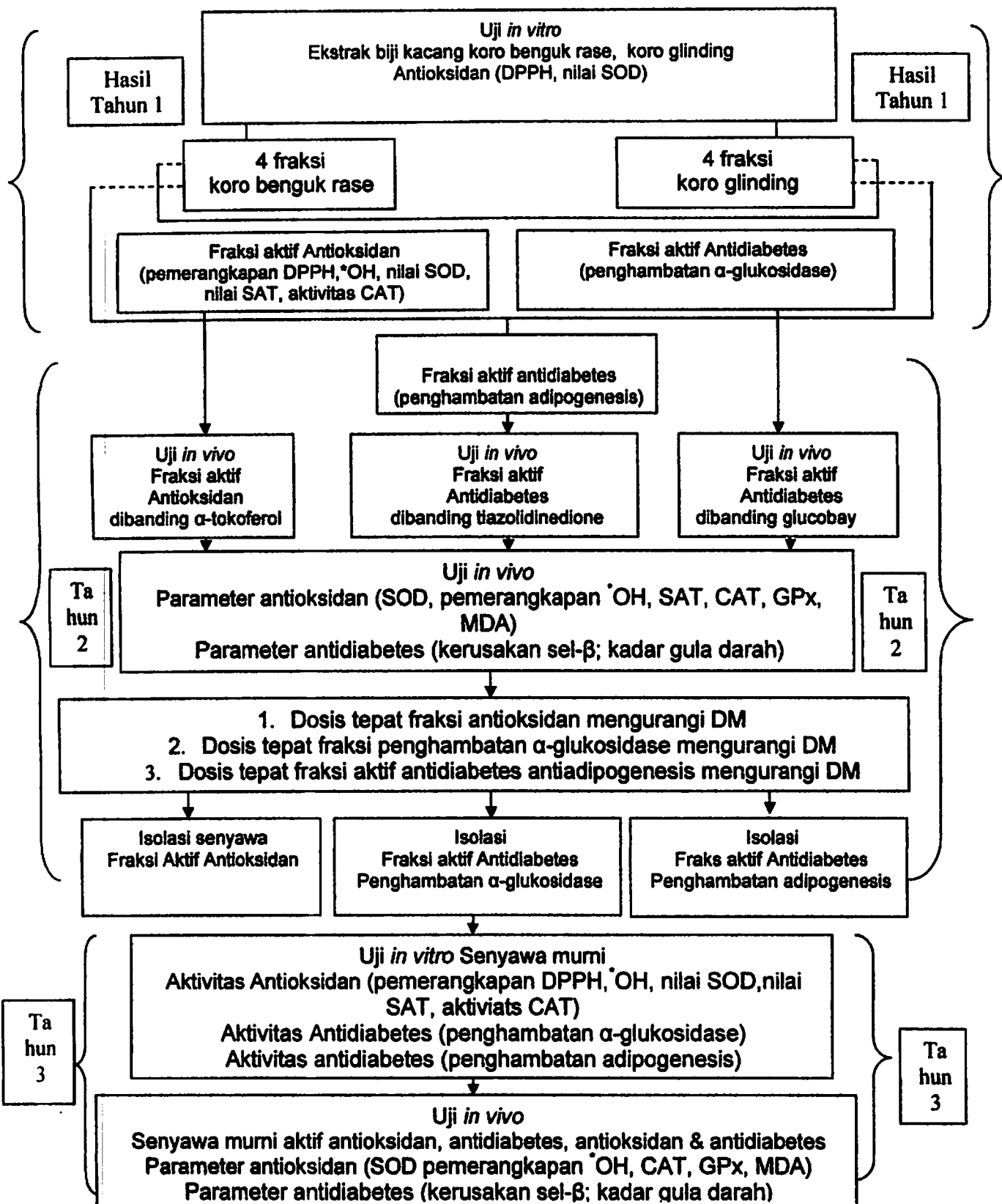
Penelitian dilakukan di Laboratorium Ilmu Pangan Fakultas Teknologi Pertanian, Jurusan Teknologi Pangan UNIKA Soegijapranata Semarang, Laboratorium Diagnostik Pramita Bandung, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia Bandung, Laboratorium Kimia Bahan Organik, Jurusan Kimia

Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran Bandung, Laboratorium Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung.

Penelitian dilaksanakan mulai bulan April 2007 sampai November 2007.

4.3. Tahap penelitian

Penelitian tahun pertama terdiri dari : 1). Ekstraksi dan fraksionasi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding; 2). Penelitian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dari ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding; 3). Penelitian uji fitokimia dari ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase dan koro glinding. Penelitian tahun I, rencana penelitian tahun II dan tahun III dapat dilihat pada Gambar 4.1. berikut :



Gambar 4.1. Skema penelitian ekstrak, fraksi, senyawa murni biji kacang koro benguk rase, koro pedang, koro glinding sebagai antioksidan dan antidiabetes secara *in vitro* dan *in vivo*

4.4. Ekstraksi biji kacang koro

4.4.1. Destilasi etanol

Untuk persiapan ekstraksi biji kacang koro menggunakan pelarut etanol murni hasil destilasi. Etanol teknis 96 % sebanyak 100 L didestilasi menghasilkan etanol 80 L.

4.4.2. Sortasi dan penggilingan biji kacang koro

Kacang koro benguk rase dan koro glinding dari petani disortasi, dipisahkan kulit biji, biji yang cacat serta kotoran-kotoran lain sehingga diperoleh kacang koro yang bersih. Selanjutnya kacang koro dicuci dan dikeringkan sampai kadar air mencapai 9 – 10 %. Sebanyak 50 kg biji kacang koro benguk rase dan 50 kg koro glinding dari petani dalam keadaan basah dan kotor diperoleh 35 kg biji kacang koro benguk rase bersih dan kering dan 38 kg kacang koro glinding. Selanjutnya biji kacang koro yang telah bersih ditepungkan dan diayak sampai berukuran 180 mesh. Dari 35 kg biji kacang koro benguk rase diperoleh tepung sebanyak 33,6 kg atau sebesar 96 %, dari 37 kg biji kacang koro glinding diperoleh tepung sebanyak 36,2 kg atau sebesar 97 %

4.4.3. Analisa proksimat biji kacang koro

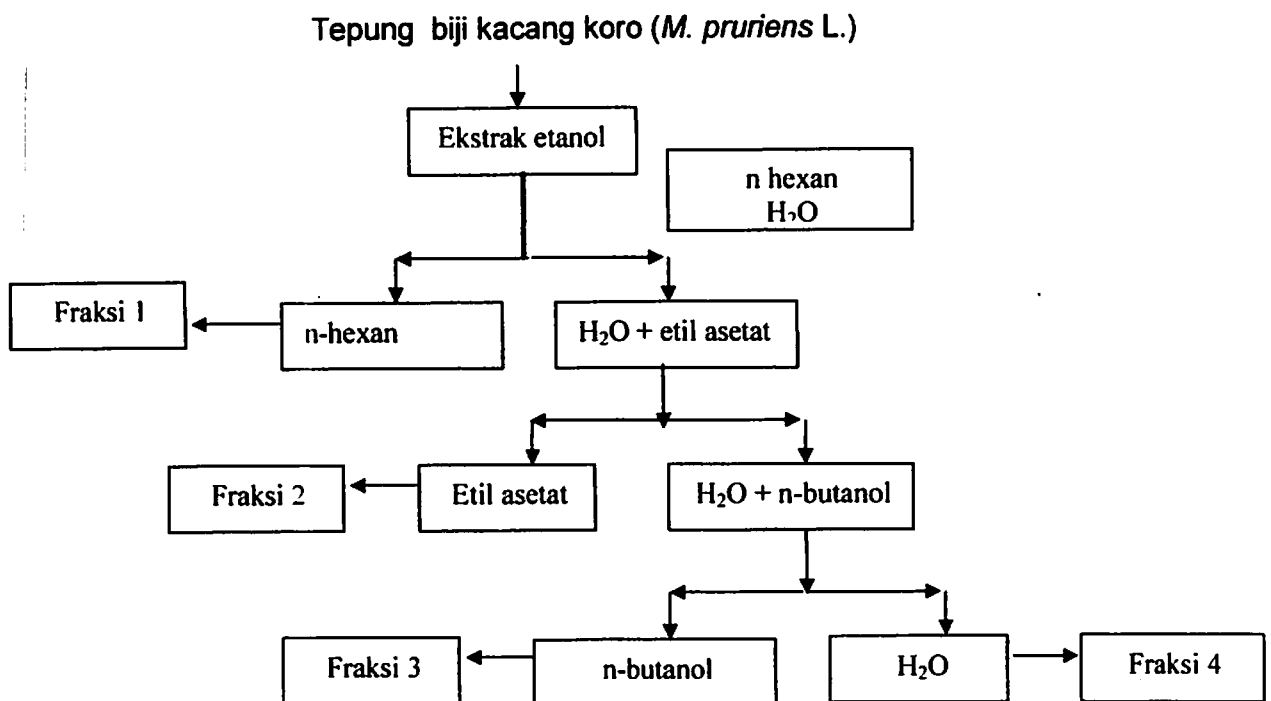
Biji kacang koro sebelum diekstraksi terlebih dahulu dianalisa kadar air, abu, protein, lemak, serat kasar dan kadar karbohidrat.

4.4.4. Ekstraksi maserasi

Biji kacang koro benguk rase diekstraksi menggunakan etanol 96 % yang telah didestilasi dengan teknik maserasi. Sebanyak 5 kg biji kacang koro yang telah dihaluskan dengan ukuran 180 mesh direndam 7,5 L etanol yang telah didestilasi selama 24 jam. Filtrat etanol ditampung, selanjutnya ampas biji kacang koro ditambah lagi 7,5 L etanol dilakukan sampai 3x perendaman. Filtrat tampungan I, II dan III dievaporasi, diperoleh ekstrak etanol biji kacang koro benguk rase. Rendemen ekstrak biji kacang koro benguk rase yang diperoleh rata-rata sebesar 10,34 %, dan rendemen ekstrak biji kacang koro glinding diperoleh rata-rata sebesar 11,76 %.

4.4.5. Fraksionasi

Partisi ekstrak etanol biji kacang koro dengan partisi cair-cair, skema ekstraksi dan fraksionasi biji kacang koro ditunjukkan pada gambar 4.2. Partisi cair-cair dari ekstrak etanol sebanyak 40 g ditambah 100 mL n-hexan dan 100 mL aquades dikocok sampai ekstrak terlarut kemudian didiamkan agar fraksi n-hexan terpisah, kira-kira setelah 12 jam residu dipisahkan dari fraksi hexan. Selanjutnya residu ditambah 100 mL n-hexan dikocok dan dibiarkan sampai terpisah kemudian filtrat fraksi n-hexan dipisahkan dari residu, partisi dilakukan sampai warna bening, kira-kira sampai 3 x penggantian pelarut. Partisi setelah menggunakan n-hexan dilanjutkan partisi menggunakan etil asetat, n-butanol dan aquades dengan cara yang sama sehingga diperoleh filtrat fraksi n-hexan, etil asetat, n-butanol dan fraksi air, selanjutnya filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* akan diperoleh fraksi n-hexan, etil asetat, n-butanol dan fraksi air.



Gambar 4.2. Skema fraksionasi biji kacang benguk rase, koro glinding

4.4.6. Pembuatan pereaksi untuk uji fitokimia

Pengujian alkaloid :

1. Pembuatan diklorometan-amoniakal : 3,6 mL NH_4OH pekat dilarutkan dalam 1 L diklorometan, kemudian ditambah 2,5 g Na_2SO_4 anhidrat lalu disaring
2. Pembuatan pereaksi Meyer : 1,36 g sublimta (HgCl_2) dilarutkan dalam 60 mL air dan 5 g KI dilarutkan dalam 10 mL air kemudian dicampur dan ditambah air hingga volume 100 mL
3. Pembuatan pereaksi Draegendorff : 27,2 g KI dilarutkan dalam 50 mL air kemudian ditambahkan 8 g $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 20 mL HNO_3 pekat, jika terbentuk kristal KNO_3 , ditambah air hingga volume menjadi 100 mL
4. Pembuatan pereaksi Wagner : 2 g KI dilarutkan dalam 5 mL air ditambah I_2 sebanyak 1,27 g kemudian diencerkan sampai volume 100 mL
5. Pembuatan pereaksi asam pikrat : serbuk asam pikrat dilarutkan dalam air hingga jenuh
6. Pembuatan pereaksi asam tanat : 5 g asam tanat serbuk dilarutkan dalam 100 mL air

Pengujian terpenoid, steroid dan saponin

1. Pembuatan pereaksi Lieberman-Burchard : asam asetat anhidrida diteteskan pada ekstrak eter yang telah dikisatkan pada plat tetes kemudian ditamabhakan asam sulfat pekat;

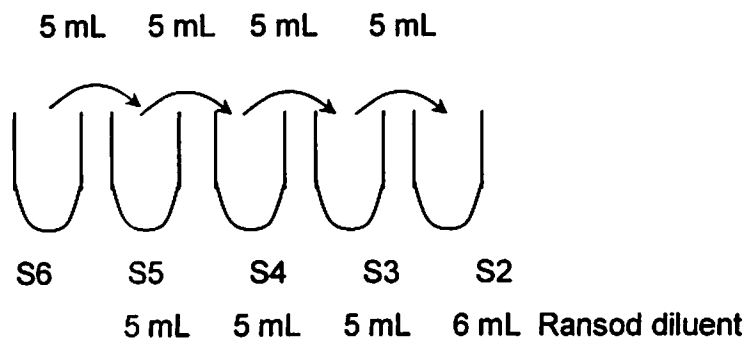
4.5. Uji antioksidan ekstrak dan fraksi biji kacang koro

4.5.1. Prosedur Pengujian aktivitas pemerangkapan radikal anion superoksida (SOD) (Randox Laboratories, 2004, Safitri, 2002 dan Safitri dkk., 2001))

1. Preparasi reagen

- 1.1). Membuat Reagen 1 dengan mencampurkan *mixed substrat* 1 vial dengan 20 mL Buffer
- 1.2). Membuat Reagen 3 dengan mencampurkan *xanthine oxidase* 1 vial dengan 10 mL aquabides
- 1.3). Membuat Reagen 4 sebagai larutan standar yaitu mencampurkan 1 vial standar dengan 10 mL aquabides (standard S6)
- 1.4). Membuat seri pengenceran selanjutnya membuat larutan S5 yaitu 5 mL S6

ditambah 5 mL sample diluent (Ransod diluent), membuat larutan S4 yaitu 5 mL S5 ditambah 5 mL sample diluent, membuat larutan S3 yaitu 5 mL S4 ditambah 5 mL sample diluent, membuat larutan S2 yaitu 3 mL S3 ditambah 6 mL sample diluent.



2. Melakukan quality control

- 2.1). Melarutkan 5 μ L RANSOD Control dengan 1 mL RANSOD diluent perbandinga (1 : 200) menghasilkan nilai kontrol sebesar 1,543 Unit/mL dengan faktor pengenceran 1 : 200 maka nilai kontrol yang diperoleh sebesar 308,6 Unit/mL dalam batas normal nilai kontrol yang ditetapkan RANSOD sebesar 291 Unit/mL.
- Batas normal yang dapat diterima yaitu $291 \pm 10\%$ atau 261,9 – 320,1 unit/mL

3. Melakukan kalibrasi reagen Ransod menggunakan alat Architect ci 8200

- 3.1). Mempersipakan standard yang sudah diencerkan (S6, S5, S4, S3, S2) pada *sample cup* sebanyak 200 μ L
- 3.2). Meletakkan *sample cup* pada rak sample dengan urutan larutan standard S2 pada posisi rak sample 1; S3 pada posisi rak sample 2; S4 pada posisi rak sample 3; S5 pada posisi rak sample 4 dan S6 pada posisi rak sample 5
- 3.3). Melakukan program kalibrasi sampai hasil kalibrasi menunjukkan status "active"

4. Preparasi sample

- 4.1). Menimbang sample ekstrak, fraksi biji kacang koro, BHT, asam askorbat dilarutkan dalam pelarut metanol sehingga diperoleh level konsentrasi 500 μ g/mL, 250 μ g/mL, 125 μ g/mL

5. Setting program meliputi :

5.1). Kalibrasi

5.2). Panjang gelombang pada 505 nm

5.5). Waktu inkubasi

5.6). Volume untuk Reagen 1, Reagen 2 untuk setiap kali pemeriksaan sampel (ekstrak, 12 fraksi biji kacang koro, tokoferol, asam askorbat, BHT pada setiap level konsentrasi)

6. Menganalisa sample

6.1). Menempatkan sample cup pada rak sample

6.2). Rak sample ditempatkan pada alat architect ci 8200 untuk operational sample

6.3). Membaca hasil aktivitas/nilai SOD pada layar/monitor komputer

4.5.2. Prosedur uji antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) (Unlu *et al.*, 2003)

Sebanyak 3,9 mL DPPH (2,9 mg DPPH dilarutkan dengan methanol sampai volume 100 mL) ditambah 0,1 mL sampel. Setelah diinkubasi pada suhu 30 °C selama 30 menit, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Pada kontrol perlakuan yang diberikan sama dengan perlakuan yang diberikan pada sampel, tetapi sampelnya diganti metanol absolut.

Pemerangkapan radikal bebas (*Radical Scavenging Activity*) DPPH dihitung dengan rumus:

$$\text{Pemerangkapan radikal (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel pada 517 nm}}{\text{Absorbansi kontrol pada 517 nm}}\right) \times 100$$

4.5.3. Prosedur uji antioksidan katalase (CAT) (Mullen dan Gifford. 1993; Harahap, 2001, Safitri, 2002)

Sebanyak 1 mL sampel ditambah 0,5 mL H₂O₂, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 240 nm pada 0 detik dan 30 detik. Pada kontrol sebanyak 1 mL sampel ditambah 0,5 mL dapar fosfat.

$$\text{Aktivitas CAT (\%)} = \left(\frac{t_{\text{sampel } 30} - t_{\text{sampel } 0}}{t_{\text{kontrol } 30} - t_{\text{kontrol } 0}}\right) \times 100$$

4.5.4. Prosedur uji antioksidan pemerangkapan radikal *OH (Okhawa, 1979 Safitri, 2002)

Mempersiapkan 4 tabung reaksi untuk perlakuan (S_1), kontrol (S_0), blanko sampel (C_1) dan blanko kontrol (C_0) untuk setiap perlakuan:

1. Masing-masing tabung diisi :

1.1. Perlakuan (S_1) diisi 12,5 μ L sampel atau ekstrak; 100 μ L PBS; 690 μ L 2-deoksiribosa; 100 μ L $FeCl_3$;

1.2. Kontrol (S_0) diisi 100 μ L PBS; 12,5 μ L DMSO; 690 μ L 2-deoksiribosa; 100 μ L $FeCl_3$;

1.3. Blanko-sampel (C_1) diisi 12,5 μ L sampel; 100 μ L PBS; 690 μ L 2-deoksiribosa; 100 μ L PBS;

1.4. Blanko-kontrol (C_0) diisi 100 μ L PBS; 12,5 μ L DMSO; 690 μ L 2-deoksiribosa; 100 μ L PBS;

2. Diinkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 5 menit

3. Masing-masing tabung ditambah lagi

3.1. Perlakuan (S_1) ditambah 100 μ L asam askorbat; 10 μ L H_2O_2

3.2. Kontrol (S_0) ditambah 100 μ L asam askorbat; 10 μ L H_2O_2

3.3. Blanko-sampel (C_1) ditambah 10 μ L H_2O_2 ; 100 μ L PBS

3.4. Blanko-kontrol (C_0) ditambah 10 μ L H_2O_2 ; 100 μ L PBS

4. Diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37⁰ C

5. Masing-masing tabung ditambah lagi

5.1. Perlakuan (S_1 s) ditambah 1000 μ L TCA; 500 μ L TBA

5.2. Kontrol (S_0) ditambah 1000 μ L TCA; 500 μ L TBA

5.3. Blanko-sampel (C_1) ditambah 1000 μ L TCA; 500 μ L TBA

5.4. Blanko-kontrol (C₀) ditambah 1000 µL TCA; 500 µL TBA

6. Dididihkan selama 8 menit

7. Didinginkan dengan es dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 532 nm

$$\text{Aktivitas pemerangkapan radikal } ^\bullet\text{OH (\%)} = \{1 - (S_1 - S_0)/(C_1 - C_0)\} \times 100$$

4.5.5. Prosedur uji antioksidan status antioksidan total (SAT) (Randox Laboratories, 2004)

Pengujian status antioksidan total (SAT) meliputi beberapa langkah yaitu :

1. Preparasi reagen :
 - 1.1. Reagen 1 (buffer)
 - 1.2. Reagen 2(chromogen) : 1 vial chromogen dilarutkan dalam 10 mL buffer
 - 1.3. Reagen 3 (substrat) : 1 mL substrat dilarutkan dalam 1,5 mL buffer
 - 1.4. Standard : 1 botol larutan standard dilarutkan dalam 1 mL aquabides
2. Semua reagen dimasukkan dalam alat Architec ci 8200
3. Kalibrasi
 - 3.1. Larutan standard dimasukkan dalam cup sample
 - 3.2. Program kalibrasi
 - 3.3. Mengevaluasi hasil kalibrasi sampai berhasil dengan status "active"
4. Melakukan quality control sampai mencapai angka untuk control SAT sebesar $1,41 \pm 0,14$
5. Proses pengukuran sampel
 - 6.1. Mempersiapkan sample dengan konsentrasi 500, 250 dan 125 µg/mL
 - 6.2. Sample dimasukkan dalam cup sample
 - 6.3. Memprogram alat architec ci 8200 yaitu sample 4 µL + reagen 1 sebanyak 200 µL + reagen 2 sebanyak 40 µL

- 6.4. Sample diinkubasikan pada suhu 37⁰ C selama 28 cycle (15 detik/cycle)
- 6.5. Pengukuran absorban pada panjang gelombang 640 nm kemudian angka dikonversikan ke mmol/L

4.5.6. Prosedur uji antidiabetes inhibisi α -glukosidase

Uji antidiabet dilakukan secara *in vitro* pada sample ekstrak, 4 fraksi dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding:

α -Glukosidase (*Saccharomyces* sp.) sebanyak 1,0 mg dilarutkan dalam 100 ml buffer fosfat (pH 7,0) berisi 200 mg bovine serum albumina. Larutan enzim ini ditambah air 1/50 sebelum diuji. Campuran reaksi ini berisi 500 μ L dari 200 mM p-nitrophenyl α -D-glukopyranosid, 990 μ L dari 100 mM buffer fosfat (pH 7,0) dan 10 μ L dari larutan sample yang akan di test atau DMSO. Sesudah campuran reaksi diinkubasi pada 37⁰ C selama 5 menit, reaksi dimulai dengan penambahan 500 μ L dari campuran enzim dan iinkubasi tepat 15 menit. Sesudah inkubasi reaksi berhenti dengan penambahan 200 μ L dari 200 mM larutan Na₂CO₃ kemudian jumlah pelepasan p nitrofenol iukur absorbansinya pada 400 nm menggunakan spektrofotometer U 3010 Hitachi. Persentasi aktivitas penghambatan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(C-S)}{C} \times 100$$

C : absorbansi aktivitas enzim tanpa sample

S : absorbansi aktivitas enzim dengan penambahan sample yang diuji.

4.6. Uji fitokimia (modifikasi cara Farnsworth)

4.6.1. Uji flavonoid

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi (sampel) dimasukkan dalam tabung reaksi berisi butiran magnesium (Mg) kemudian ditambahkan HCl 2N dan dipansakan selama 5 – 10 menit . Setelah dingin, disaring kemudian filtrat ditambah amil alkohol. Dilihat perubahan warna, apabila warna merah/jingga menunjukkan adanya kandungan flavonoid.

4.6.2. Uji fenol

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi (sampel) ditambahkan Fe (III) klorida 1 %, bila terjadi perubahan warna hijau/merah/ungu/biru/hitam menunjukkan adanya kandungan fenol

4.6.3. Uji saponin

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi (sampel) ditambah air kemudian dididihkan dalam penangas air selama 5 menit kemudian dikocok kuat/ Apabila terbentuk busa stabil selama \pm 30 menit menunjukkan adanya kandungan saponin

4.6.4. Uji triterpenoid dan steroid

Sebanyak 1g ekstrak atau fraksi ditambah asam asetat anhidrat sampai terendam, dibiarkan selama 15 menit, kemudian ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Apabila terdapat endapan hijau/biru menunjukkan adanya kandungan steroid, adanya endapan merah/jingga menunjukkan adanya kandungan triterpenoid.

4.6.5. Uji terpenoid

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi dalam plat tetes ditambahkan vanilin dan asam sulfat, adanya warna ungu menunjukkan adanya kandungan terpenoid

4.6.7. Uji tanin

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi ditambahkan 2 mL HCl 2N dipanaskan selama 30 menit kemudian didinginkan dan disaring, filtrat ditambah amil alkohol apabila terbentuk warna ungu menunjukkan adanya kandungan tanin.

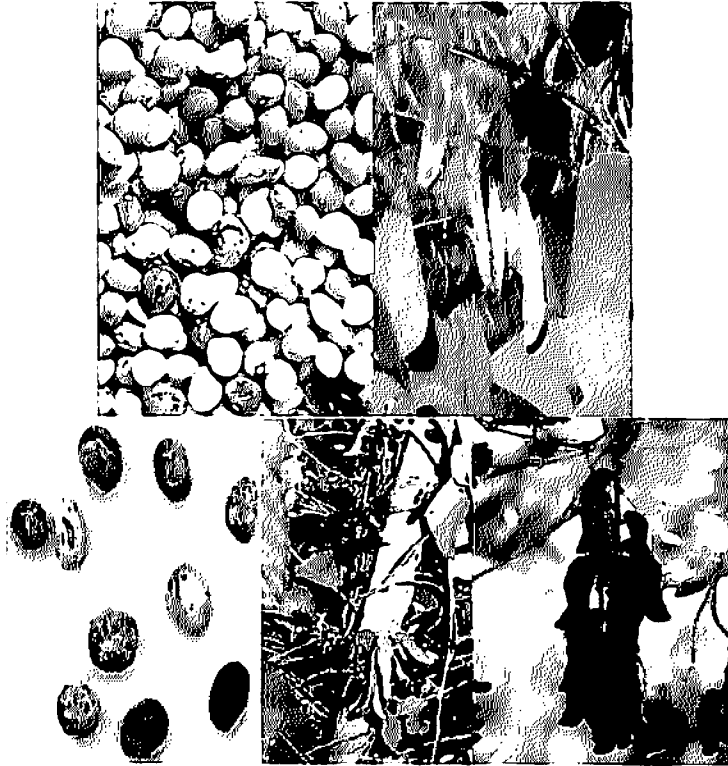
4.6.8. Uji alkaloid

Sebanyak 1 g ekstrak atau fraksi ditambah ammonia 10 % kemudian diekstraksi dengan kloroform dan ditambah HCl 1N. Hasil ekstraksi akan terbagi 2 lapisan, lapisan bagian atas (lapisan asam) dibagi dalam 2 tabung. Tabung satunya ditambah pereaksi Meyer, tabung yang lain ditambah pereaksi

Dragendorf, bila terbentuk warna kuning menunjukkan adanya kandungan alkaloid.

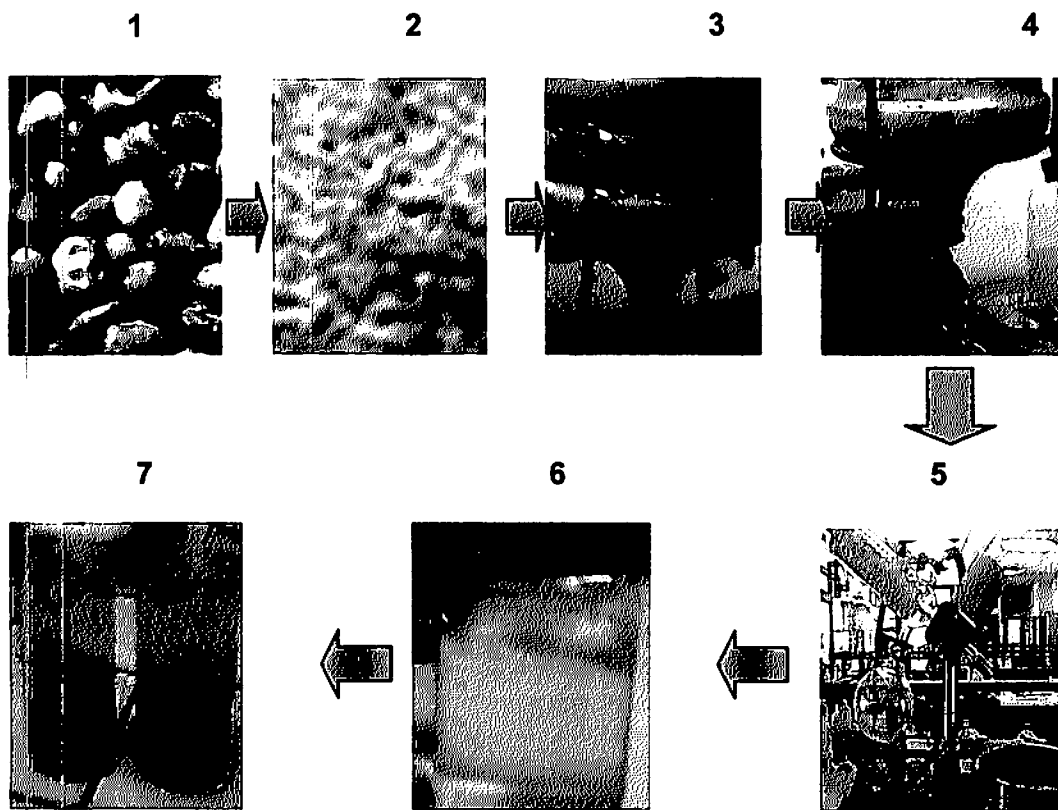
4.7. Diagram alir penelitian

4.7.1. Gambar bunga, daun dan biji kacang koro



Gambar 4.3. Daun, polong, biji kacang koro glinding (*Phaseolus lunatus* L) dan koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.)

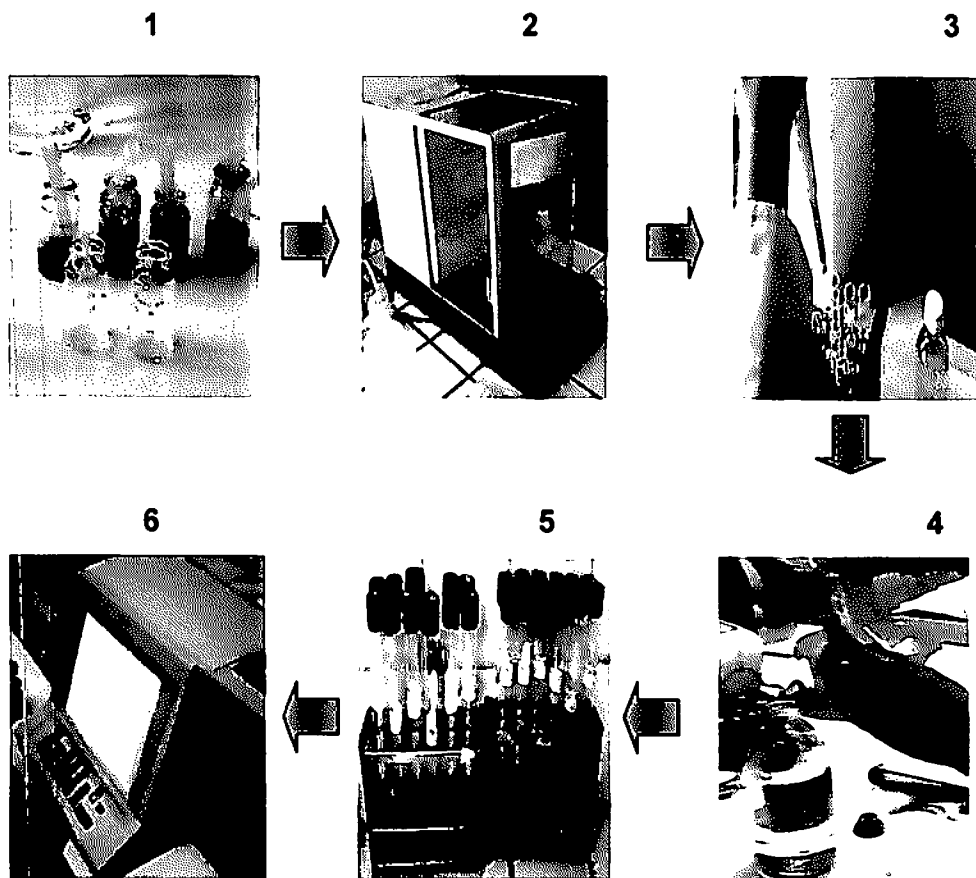
4.7.2. Gambar diagram alir ekstraksi maserasi



1. Biji kacang koro
2. Tepung biji kacang koro
3. Tepung direndam etanol dalam maserator
4. Etanol ditampung
5. Filtrat etanol
6. Filtrat etanol dievaporasi
7. Ekstrak biji kacang koro bentuk pasta

Gambar 4.4. Diagram alir pembuatan ekstrak biji kacang koro secara maserasi

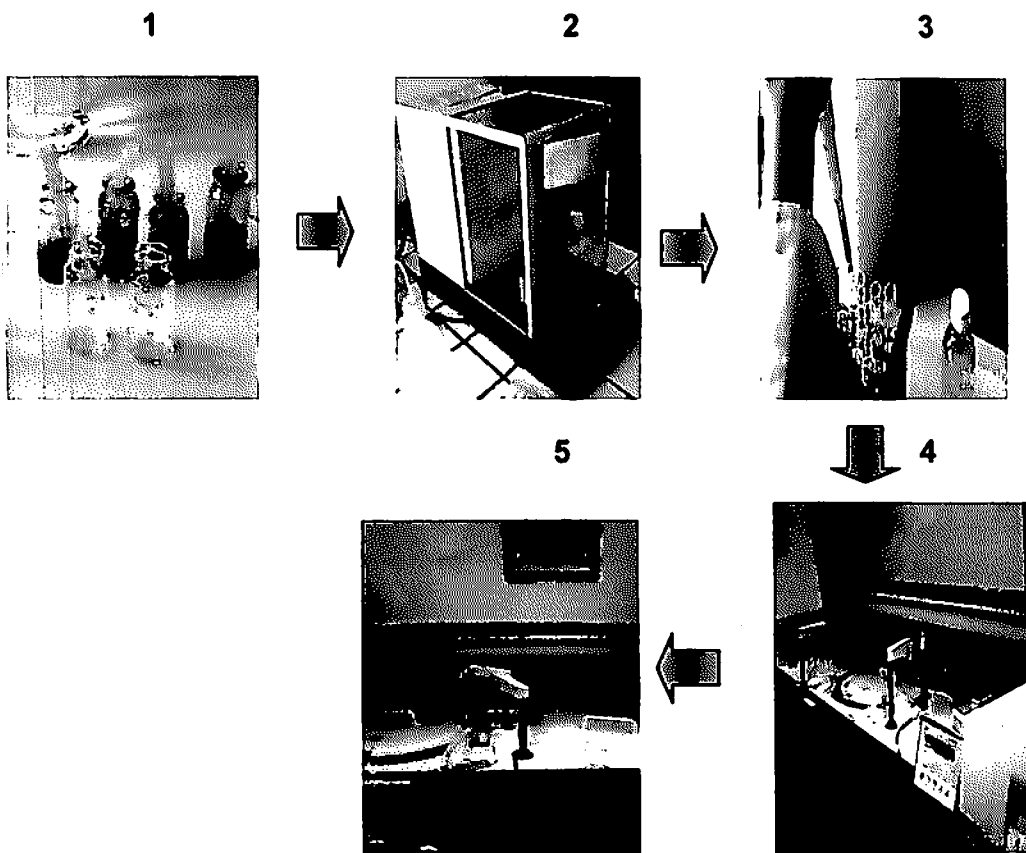
4.7.3. Diagram alir uji pemerangkapan DPPH



1. Ekstrak, fraksi, antioksidan α -tokoferol, karoten, BHT, BHA
2. Ekstrak, fraksi, antioksidan ditimbang
3. Ekstrak, fraksi, antioksidan dilarutkan dengan metanol sehingga diperoleh konsentrasi $500 \mu\text{g/mL}$; $250 \mu\text{g/mL}$; $125 \mu\text{g/mL}$
4. Ekstrak, fraksi, antioksidan konsentrasi $500 \mu\text{g/mL}$; $250 \mu\text{g/mL}$; $125 \mu\text{g/mL}$ Sebanyak $0,1 \text{ mL}$ ditambah $3,9 \text{ mL}$ DPPH
5. Dibiarkan selama 30 menit
6. Dibaca serapan warna menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 517 nm

Gambar 4.6. Diagram alir uji DPPH

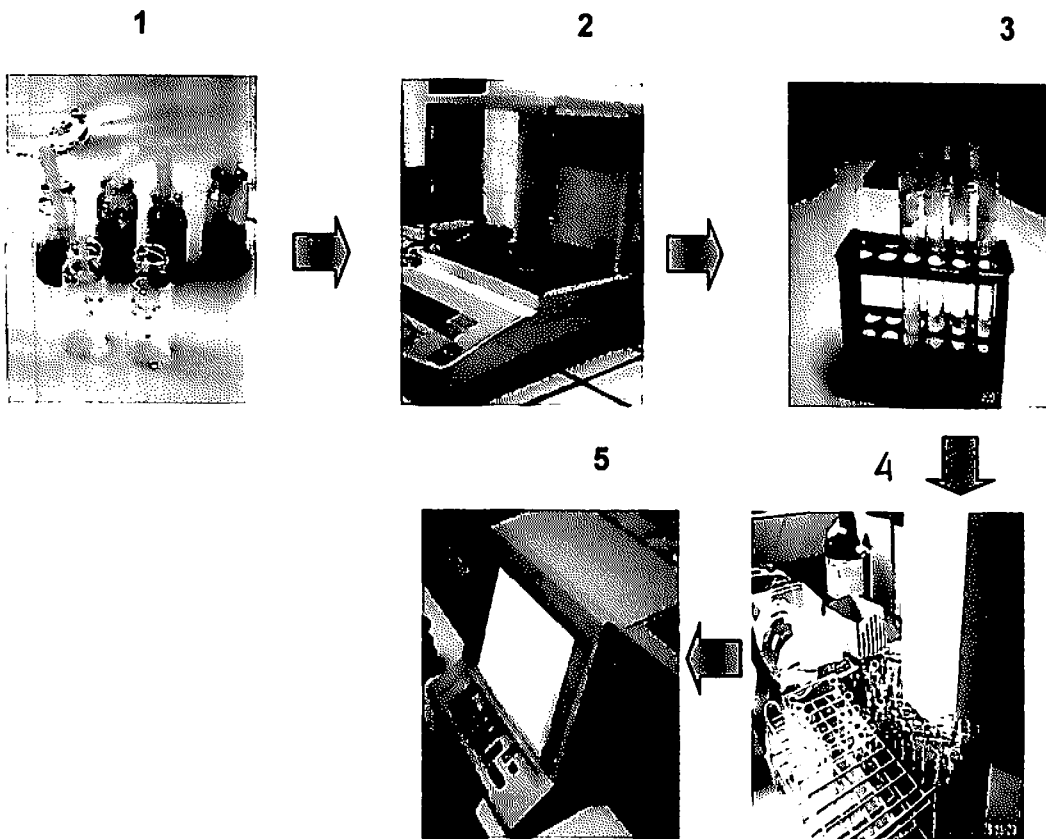
4.7.4. Diagram alir uji pemerangkapan radikal anion superoksida



- 1. Ekstrak, fraksi, antioksidan α -tokoferol, karoten, BHT, BHA**
- 2. Ekstrak, fraksi, antioksidan ditimbang**
- 3. Ekstrak, fraksi, antioksidan dilarutkan dengan metanol sehingga diperoleh konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$**
- 4. Melakukan quality control pada alat architect ci 8200, klaibrasi dan setting program absorbansi, waktu inkubasi, volume sampel**
- 5. Operational sample dan membaca hasil pada monitor cumputer**

Gambar 4.7. Diagram alir uji SOD

4.7.5. Diagram alir uji katalase



1. Ekstrak, fraksi, antioksidan α -tokoferol, karoten, BHT, BHA
2. Ekstrak, fraksi, antioksidan ditimbang
3. Ekstrak, fraksi, antioksidan dilarutkan dengan metanol sehingga diperoleh konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$; 250 $\mu\text{g/mL}$; 125 $\mu\text{g/mL}$
4. Sebanyak 1 mL sampel ditambah 0,5 mL H_2O_2 , untuk kontrol sebanyak 1 mL sampel ditambah 0,5 mL dapar fosfat
5. Sampel dan kontrol diukur serapan warnanya pada 0 detik dan 30 detik menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang

Gambar 4.8. Diagram alir uji katalase

V. HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Analisa proksimat biji kacang koro

Berdasarkan hasil pengamatan di lapangan khususnya Kecamatan Weru - Kabupaten Sukoharjo dan Kecamatan Baturetno Kabupaten Wonogiri, berbagai jenis tanaman koro yang dibudidayakan yaitu kurang lebih terdapat 20 jenis tanaman koro, tetapi yang paling banyak ditanam adalah koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.) dan koro glinding (*Phaseolus lunnatus* L.). Kacang koro benguk rase digunakan sebagai bahan baku tempe benguk, namun kurang disukai karena tekstur keras dan kasar, rasa kurang enak, warna tidak menarik, sehingga nilai ekonomi kacang koro benguk rase masih rendah. Kacang koro glinding digunakan sebagai bahan baku tempe dan kecap, tetapi pemanfaatannya belum optimal sehingga nilai ekonomisnya juga masih rendah. Berdasarkan hasil pengamatan di lapangan jumlah ke 2 jenis koro tersebut melimpah sehingga dalam penelitian ini koro yang digunakan sebagai sample adalah koro benguk rase dan koro glinding. Diharapkan dari hasil penelitian dapat meningkatkan nilai ekonomi kacang koro dan kacang koro dapat digunakan sebagai tanaman obat.

Berdasarkan hasil analisa proksimat biji kacang koro benguk rase dan koro glinding dengan 3 ulangan didapatkan kadar air, abu, protein, lemak, serat kasar dan karbohidrat dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1. Hasil pengujian proksimat biji kacang koro benguk rase

Jenis kacang koro	Ulangan	Kadar air (%)	Abu (%)	Protein (%)	Lemak (%)	Serat kasar (%)	Karbohidrat (%)
1. Benguk rase	1	9,310	3,300	17,420	7,450	40,190	23,330
	2	8,700	3,270	16,960	7,500	39,780	23,790
	3	9,360	3,350	16,100	7,650	40,000	23,540
Rata-rata		9,123	3,307	16,827	7,533	39,990	23,660
2. Koro glinding	1	11,720	3,400	14,504	3,865	6,850	59,661
	2	11,680	3,450	20,093	4,207	7,150	53,420
	3	11,700	3,350	16,388	4,260	6,440	57,862
Rata-rata		11,699	3,400	16,995	4,110	6,810	56,981

Hasil analisa proksimat menunjukkan bahwa biji kacang koro benguk rase mengandung serat kasar dan karbohidrat tinggi, berbeda dengan hasil analisis Siddhuraju *et al.* (1996) biji kacang koro mengandung protein kasar sebesar 314,4 g/kg atau 31,4 %; serat kasar sebesar 51,6 g/kg atau 5,16 %; lemak kasar sebesar 67,3 g/kg atau 6,73 %, abu mengandung 41,1 g/kg atau 4,11 %, karbohidrat sebesar 526,6 g/kg atau 52,66 %. Sedangkan biji kacang koro glinding mengandung protein sebesar 16,99 % hampir sama dengan koro benguk rase, tetapi kadar lemak biji koro glinding sebesar 4,11 % lebih rendah dibanding koro benguk rase dan kadar serat kasar biji koro glinding lebih rendah dibanding koro benguk rase, tetapi kadar karbohidrat biji koro glinding jauh lebih besar dibanding biji koro benguk rase. Kadar karbohidrat koro glinding hampir sama dengan hasil penelitian yang dilakukan Siddhuraju *et al.* (1996) lebih dari 50 %. Nilai proksimat yang berbeda tersebut dapat dikarena adanya perbedaan lokasi penanaman, kemurnian benih, tingkat pemeliharaan, dll.

5.2. Ekstraksi maserasi

Biji kacang koro benguk rase diekstraksi menggunakan etanol 96 % yang telah didestilasi dengan teknik maserasi. Sebanyak 5 kg biji kacang koro benguk rase dan koro glinding yang telah dihaluskan dengan ukuran 180 mesh direndam 7,5 L etanol yang telah didestilasi selama 24 jam. Filtrat etanol ditampung, selanjutnya ampas biji kacang koro ditambah lagi 7,5 L etanol dilakukan sampai 3 x perendaman. Filtrat tampungan I, II dan III dievaporasi, diperoleh ekstrak etanol biji kacang koro benguk rase. Rendemen ekstrak biji kacang koro benguk rase diperoleh rata-rata sebesar 10,34 % dan dari kacang koro glinding diperoleh rendemen sebesar 11,76 %. Ekstrak biji kacang koro benguk rase dan koro glinding berbentuk pasta dari 5 kg tepung biji koro diperoleh rata-rata 517,20 g untuk koro benguk rase atau 10,34 % dan 588,04 g atau 11,76 % untuk koro glinding. Hasil ekstraksi maserasi biji kacang koro dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2. Hasil rendemen ekstraksi metode maserasi dari biji kacang koro benguk rase dan koro glinding

Jenis kacang koro	Ulangan	Berat tepung biji kacang koro (kg)	Hasil ekstrak biji kacang koro (g)	Rendemen (%)
1. Benguk rase	1	5 kg	516,56	10,33
	2	5 kg	520,07	10,40
	3	5 kg	514,97	10,30
	Rata-rata		517,20	10,34
2. Koro glinding	1	5 kg	578,67	11,57
	2	5 kg	598,21	11,96
	3	5 kg	587,23	11,74
	Rata-rata		588,04	11,76

5.3. Fraksionasi

Partisi ekstrak etanol biji kacang koro dengan partisi cair-cair. Persiapan untuk fraksionasi adalah memurnikan hexan, butanol dan etil asetat dengan destilasi. Destilasi hexan, butanol dan etil asetat menghasilkan rendemen rata-rata 80 % yaitu dari 10 L hexan, butanol dan etil asetat menghasilkan 8 L hexan, butanol dan etil asetat murni.

Fraksionasi dilakukan dengan partisi cair-cair filtrat masing-masing pelarut n-hexan, etil asetat, n-butanol dan air dievaporasi sehingga diperoleh fraksi n-hexan, etil asetat, n-butanol dan fraksi air serta dapat diketahui rendemen masing-masing fraksi. Hasil partisi dari ekstrak dapat dilihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3. Hasil rendemen partisi cair-cair dari ekstrak biji kacang koro

Jenis koro	Ulangan	Berat ekstrak koro (g)	Berat F. hexan (g)	Berat F. etil asetat (g)	Berat F. butanol (g)	Berat F. air (g)
1. Bungk rase	1	130,967	28,986 (22,13 %)	0,452 (0,35 %)	3,201 (2,44 %)	4,160 (3,18 %)
	2	150,356	35,334 (23,50 %)	0,586 (0,39 %)	4,189 (2,79 %)	4,811 (3,20 %)
	3	120,345	27,077 (22,50 %)	0,456 (0,38 %)	3,345 (2,78 %)	4,104 (3,41 %)
	Rata-rata Rendemen		22,71 %	0,37 %	2,67 %	3,26 %
2. Koro glinding	1	100,453	29,734 (29,60%)	1,567 (0,16 %)	5,025 (5,00 %)	7,745 (7,71 %)
	2	120,321	38,623 (32,10 %)	21,658 (0,17 %)	5,775 (4,80 %)	9,686 (8,05 %)
	3	140,564	38,655 (27,5 %)	26,707 (0,190 %)	6,747 (4,80 %)	12,088 (8,60 %)
	Rata-rata rendemen		29,73 %	0,173 %	4,86 %	8,12 %

Berdasarkan hasil partisi cair-cair menunjukkan bahwa rendemen tertinggi dari biji kacang koro bungk rase terdapat pada fraksi n-hexan dengan rata-rata rendemen sebesar 22,71 % dari ekstrak biji kacang koro sedangkan fraksi etil asetat dengan rata-rata rendemen sebesar 0,37 % merupakan rendemen terendah dari ekstrak biji kacang koro, rata-rata rendemen fraksi butanol sebesar 2,67 % sedangkan rata-rata rendemen fraksi air sebesar 3,26 % sedangkan rendemen tertinggi dari biji kacang koro glinding terdapat pada fraksi heksan sebesar 29,73 % dan terendah terdapat pada fraksi etil asetat sebesar 0,173 %. Semua fraksi yang dihasilkan dari biji koro glinding lebih besar dibandingkan biji koro bungk rase.

5.4 Uji fitokimia

Menurut Horberne (1987) uji fitokimia atau kimia tumbuhan yang berada antara disiplin ilmu kimia organik bahan alam dan biokimia tumbuhan serta berkaitan erat dengan keduanya dengan perhatian aneka ragam senyawa organik yang dibentuk oleh tumbuhan yaitu mengenai struktur kimia, biosintesis, perubahan serta metabolismenya, penyebarannya secara alamiah dan fungsi biologisnya. Uji fitokimia adalah untuk mengetahui golongan senyawa yang dikandung oleh tumbuhan pada masing-masing organ tumbuhan berdasarkan

asal biosintesis, sifat kelarutan dan adanya gugus fungsi kunci tertentu. Berdasarkan golongan senyawa dapat diketahui aktivitas dan fungsi biologisnya. Pada penelitian ini uji fitokimia berdasarkan modifikasi cara Farnsworth berdasarkan penggolongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, triterpen, steroid, tanin, fenol, terpenoid. Hasil uji fitokimia ekstrak dan fraksi biji kacang koro dapat dilihat pada tabel 5.4

Tabel 5.4. Hasil uji fitokimia pada ekstrak dan fraksi biji kacang koro

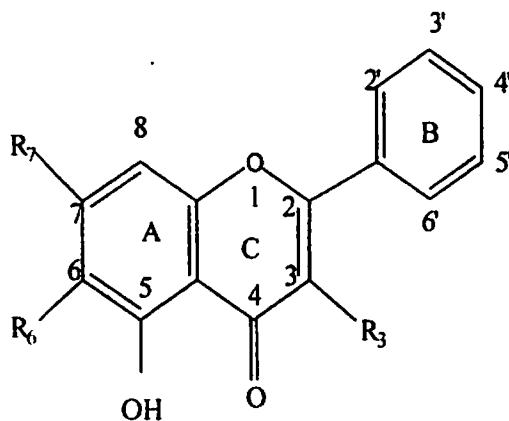
No	Sampel	Golongan senyawa							
		Tanin	Flavonoid	Fenol	Saponin	Terpenoid	Triterpenoid	Steroid	Alkaloid
I.	Benguk rase								
1	Ekstrak	+++	+++	++	+	+	-	++	++
2	Fraksi hexan	-	+	+	-	+	-	+	-
3	Fraksi etil asetat	++	+++	++	-	-	-	+	+
4	Fraksi butanol	+++	+++	++	+	-	-	+	+
5	Fraksi air	++	+	+	+	-	-	-	++
II.	Koro glinding								
1	Ekstrak	++	++	+	+	+	-	+	+
2	Fraksi hexan	-	+	+	-	+	-	+	-
3	Fraksi etil asetat	+	+	+	+	+	-	+	+
4	Fraksi butanol	++	++	+	+	+	-	+	+
5	Fraksi air	++	+	+	+	-	-	+	+

Ket: +++ = Golongan senyawa yang terkandung banyak
 ++ = Golongan senyawa yang terkandung sedang
 + = Golongan senyawa yang terkandung sedikit
 - = Golongan senyawa yang terkandung tidak terdeteksi

Hasil uji fitokimia menunjukkan terdapat perbedaan golongan senyawa yang terdapat pada biji kacang koro benguk rase dan koro glinding, perbedaan

terutama kadar golongan senyawa flavonoid dalam biji koro glinding terutama pada ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi butanol lebih rendah dibanding pada ekstrak, fraksi etil asetat dan fraksi butanol koro benguk rase. Kadar fenol pada ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi butanol koro benguk rase lebih besar (++) dibanding pada ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi butanol koro glinding. Ekstrak dan 4 fraksi koro benguk rase, ekstrak dan 4 fraksi koro glinding tidak mengandung golongan triterpenoid.

Flavonoid terbentuk dalam tumbuhan berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin dan malonat. Struktur dasar flavonoid adalah inti flavan yang terdiri atas 15 atom karbon yang terangkai dalam tiga cincin (C₆-C₃-C₆) yang ditandai dengan A,B,C (gambar 5.1.). Berbagai kelas flavonoid berbeda dalam tingkat oksidasi dan pola substitusi pada cincin C, sedangkan perbedaan setiap senyawa dalam kelas adalah berbeda dalam substitusi pada cincin A dan B. Terdapat beberapa kelas flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3 ol, dan antosianin (Pieta, 2000; Friedli, 2000). Senyawa flavonoid bersifat antioksidan yang dapat menghambat kerja enzim xantin oksidase sehingga menghambat pembentukan asam urat (Halliwell dan Gutteridge, 1999).



Gambar 1. Struktur flavon (Pieta, 2000)

Alkaloid adalah senyawa organik yang terdiri dari C, H, N dan O. Beberapa alkaloid bersifat racun mempunyai efek fisiologis sehingga banyak digunakan sebagai obat. Yang termasuk golongan alkaloid antara lain adalah :

1) Curare merupakan ekstrak yang mematikan, sebagai relaxant otot; 2) Atropine sebagai dilatator pupil mata, sebagai physostigmine untuk jenis penyakit otot tertentu; 3) morphine adalah alkaloidnarkotik; 4) Codeine adalah pelepas sakit; 5) Cocaine untuk anestetik lokal; 6) Jenis lain yang tergolong alkaloid adalah quinine, caffeine, nicotine, strychnine, serotonin (Colombia University, 2003). Sedangkan menurut Wikipedia (2005) alkaloid adalah senyawa organik yang mengandung nitrogen, mempunyai efek farmakologis terhadap hewan dan manusia, nama alkaloid berasal dari turunan alkaline, nama alkaloid digunakan untuk senyawa mengandung nitrogen.

Saponin adalah salah satu golongan senyawa yang terdapat dalam berbagai spesies tumbuhan. Saponin adalah glikosida triterpen dan sterol, bersifat larut dalam air, etanol (Robinson, 1991), etil asetat, n-butanol dan digolongkan ke dalam senyawa polar (Hosetmann *et al.*, 1995). Saponin merupakan senyawa aktif permukaan, bersifat seperti sabun, mampu membentuk busa dan menghemolisis darah (Harborne, 1987). Pencarian saponin dari tumbuh-tumbuhan sebagai sumber saponin yang dapat dirubah menjadi sterol hewan sebagai bahan kortison, setrogen obat kontrasepsi (Horborne, 1987).

Terpenoid mencakup sejumlah besar senyawa tumbuhan terkandung dalam minyak esensial, secara biosintesis berasal dari senyawa yang sama yaitu berasal dari isoprene dan kerangka karbonnya dibangun oleh penyambungan dua atau lebih satuan $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CH}=\text{CH}_2$. (C_5H_8). Hidrokarbon terpena diklasifikasikan berdasarkan jumlah unit isoprene yaitu : monoterpena (C_{10}) terdiri dari 2 unit isopropene, sekuisterpena (C_{15}) terdiri dari 3 unit isoprene, diterpen (C_{20}) terdiri dari 4 unit isoprene, triterpen (C_{30}) terdiri dari 6 unit isoprene dan tetrapene terdiri dari 8 unit isoprene (Kirste, 1994; Wikipedia, 2006). Terpenoid pada tanaman banyak digunakan untuk obat tradisional, masih dalam penelitian sebagai antibakteri, antineoplastik dan berbagai efek pharmaceutical. Terpenoid memberikan bau harum pada eucalyptus (tanaman asli Australia), cita rasa pada cinnamon, clove, ginger serta memberikan warna kuning pada bunga (Wikipedia, 2006).

Triterpenoid dapat dibagi menjadi empat golongan senyawa : 1) triterpena sebenarnya steroid, saponin dan glikosida jantung (kardenolida). Triterpena tertentu karena rasanya terutama kepahitannya, contohnya limonin senyawa

pahit larut lemak terdapat dalam buah jeruk. Kelompok triterpen pahit yang lain yaitu kukurbitasin terdapat pada *Cucurbitaceae*, *Cruciferae* (Harborne, 1987). Ekstrak daun nimba (*Azadirachta indica*) mengandung terpenoid, desaktilimbin, quersetin dan sitosterol mempunyai aktivitas antifungal terhadap fungi penghasil aflatoksin (Allameh *et al.*, 2002). Senyawa monoterpena antara lain pinene, nerol, citral, camphor, menthol, limonene; senyawa sekuisterpena antara lain nerolidol, farnesol; senyawa diterpena antara lain phytol, vitamin A₁; senyawa triterpen antara lain qualene; senyawa tetrapena antara lain carotene (provitamin A₁) (Kirste, 1994).

Anabolik steroid adalah zat sintesis testoteron yang memiliki struktur kimia yang sama dengan testoteron. Anabolik steroid merangsang pertumbuhan otot dan mengakibatkan perkembangan ciri-ciri seksualitas pria. Steroid dapat meningkatkan kumpulan otot yang tidak berlemak, bila dikombinasikan dengan protein dan makanan kalori tinggi dapat meningkatkan kekuatan otot, meningkatkan sifat kompetisi dan keagresifan yang mendorong seseorang olah ragawan berlatih lebih keras, dapat merubah suasana hati dan libido (Pakta Foundation, 2005).

Buah dan daun mahkotadewa (*Phaleria macrocarpa*) mengandung berbagai senyawa antara lain flavonoid dan tanin, keduanya mempunyai efek anti kanker dan menunjang penyembuhan kanker (Sumastuti dan Sonlimar, 2002).

Lengkuas atau laos, laja atau isem (*Alpina galanga* SW) bermanfaat sebagai antifungi dan antikembung karena mengandung beberapa senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan minyak atsiri (Anonimus, 2005b).

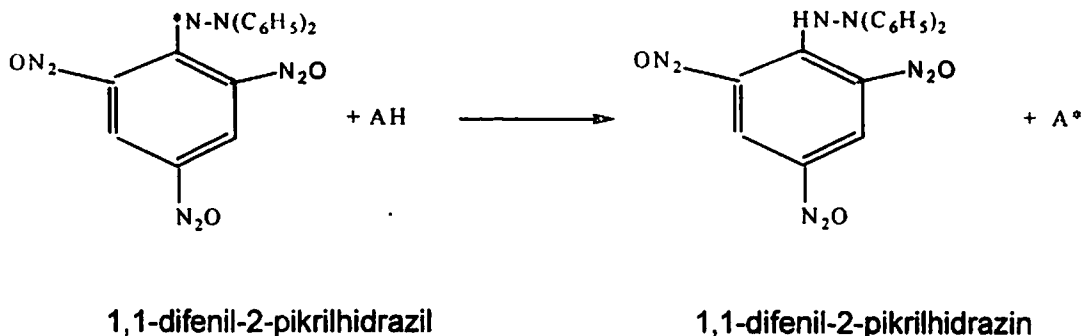
Setiap golongan senyawa memiliki aktivitas yang kompleks antara lain sebagai antioksidan, antikanker, antimikroba atau gabungan beberapa aktivitas. Untuk mengetahui aktivitas spesifik, perlu dilakukan isolasi senyawa murni kemudian dilanjutkan uji aktivitas *in vitro* maupun *in vivo*.

5.5. Aktivitas antioksidan

5.5.1. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH ekstrak biji kacang koro benguk rase dan koro glinding

Radikal DPPH merupakan senyawa radikal sintetik yang larut dalam pelarut organik polar seperti metanol pada suhu kamar, DPPH adalah radikal bebas karena memiliki 1 elektron yang tidak berpasangan, berwarna ungu tua dan dapat diukur pada panjang gelombang λ 517 nm (Hudson, 1999; Pokorny *et al.*, 2001).

Uji aktivitas antioksidan secara *in vitro* menggunakan parameter aktivitas pemerangkapan (*scavenging*) radikal DPPH ini merupakan salah satu uji untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu bahan makanan (Pokorny *et al.*, 2001), Adanya senyawa aktif antioksidan pemerangkap radikal bebas DPPH dalam sampel ditandai dengan perubahan DPPH berwarna ungu tua setelah menerima proton dari antioksidan dan mereduksi warna molekul DPPH yang terprotonasi berubah menjadi 1,1 difenil-2-pikrilhidrazin yang berwarna kekuningan atau kuning pucat (Hudson, 1990; Unlu *et al.*, 2003).



Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak biji kacang koro benguk rase (EKKB) dan ekstrak biji kacang koro glinding (EKKG) yaitu aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH diuji dengan sidik ragam (lampiran 1) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH. Kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (UJBD) pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.5. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan dapat dilihat pada Gambar 5.1.

Tabel 5.5. Rataan dan UJBD jenis antioksidan EKKB, EKKG dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	40,8227 a B	50,9499 b C	55,0479 c B
B-karoten	6,4747 a A	14,352 b A	20,1813 c A
BHA	47,7190 a C	80,6772 b E	91,5754 c D
BHT	58,9686 a D	90,5308 b F	94,9132 c D
EKKB	49,8521 a C	56,6434 b D	65,1141 c C
EKKG	40,2955 a B	48,3131 ab B	56,8401 b B

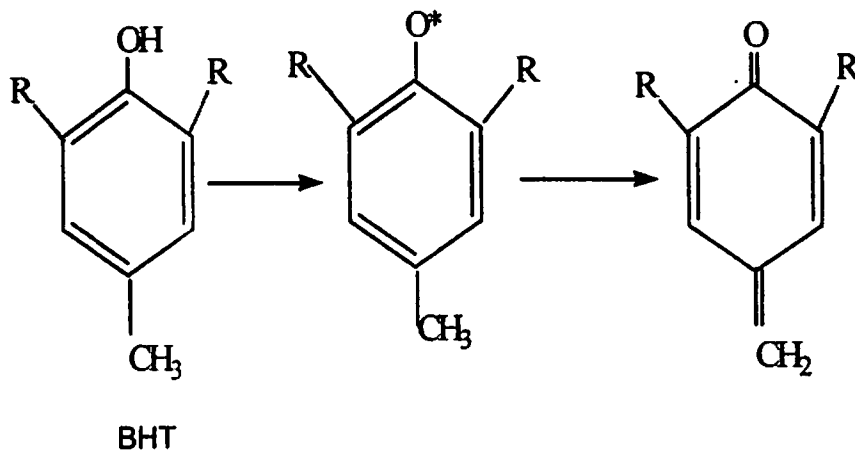
Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Dari hasil UJBD menunjukkan semakin tinggi konsentrasi jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, asam askorbat, BHT dan EKKB, EKKG semakin tinggi pula kemampuannya dalam memerangkap radikal bebas DPPH, disebabkan semakin tinggi konsentrasi EKKB, antioksidan pembanding mengakibatkan peningkatan konsentrasi senyawa aktif antioksidan yang terkandung di dalamnya. Pada EKKG setiap peningkatan konsentrasi tidak meningkatkan aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, konsentrasi 125 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$, demikian juga konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$, hal ini diduga karena aktivitas antioksidan pada EKKG lemah, hal ini bisa dilihat pada golongan senyawa fenol yang dikandung EKKG dalam kadar sedikit (+), demikian pula kadar flavonoid dalam kadar cukup (++) sehingga kurang aktif aktivitas antioksidannya. Senyawa-senyawa yang terkandung dalam EKKB berdasarkan uji fitokimia mengandung dalam kadar tinggi (+++) golongan senyawa flavonoid dan tanin. Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH dari EBKK menunjukkan lebih tinggi dibanding tokoferol dan asam askorbat tetapi lebih rendah dibanding BHT hal ini diduga karena EBKK berdasar uji fitokimia mengandung flavonoid dengan kadar tinggi hal ini sesuai Hall dan Cuppet (1997) bahwa flavonoid adalah senyawa turunan fenol yang terkandung dalam berbagai jenis tumbuhan dan memiliki aktivitas antioksidan. EKKB

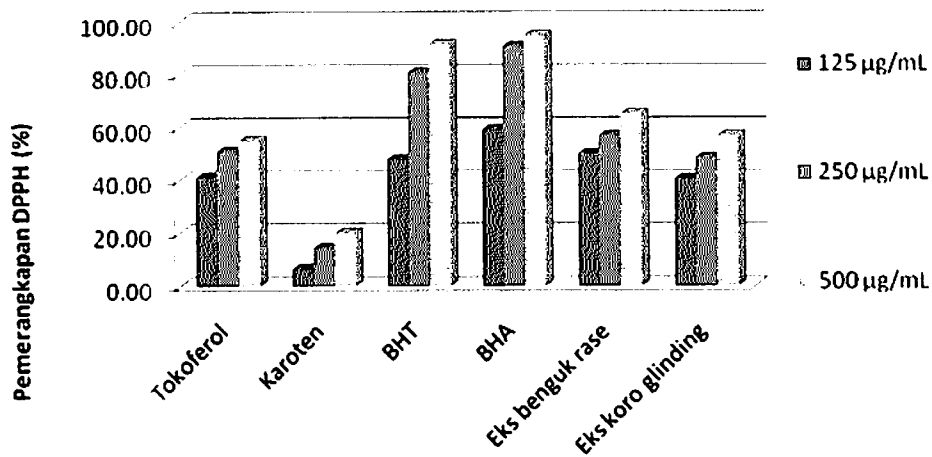
mengandung golongan senyawa fenol dalam kadar cukup (++) sehingga menunjukkan aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH sedang (65,11 %) , hal ini sesuai penelitian Serafani *et al.* (2000) bahwa kadar fenol yang tinggi pada berbagai jenis minuman anggur dan teh akan meningkatkan aktivitas antioksidan.

Flavonoid terbentuk dalam tumbuhan berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin dan malonat. Terdapat beberapa kelas flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3 ol, dan antosianin (Pieta, 2000; Friedli, 2000). Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH dari EKKB lebih rendah dibanding BHT dikarenakan dalam EKKB masih terdapat berbagai senyawa lain yang tidak atau memiliki aktivitas antioksidan rendah antara lain tanin, saponin, terpenoid, steroid, alkaloid.

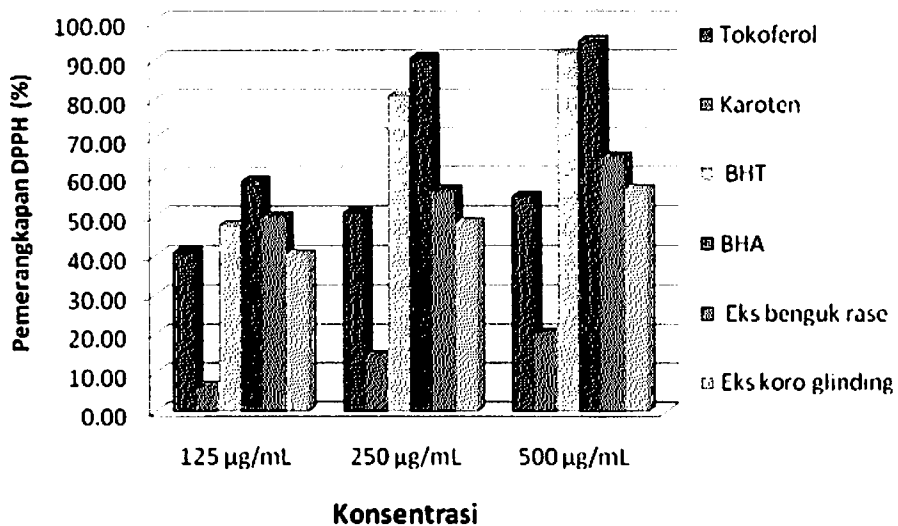
Berdasarkan tabel 5.5. terbukti bahwa BHT merupakan antioksidan paling aktif dalam memerangkap radikal bebas DPPH dibanding EKKB, EKKG, tokoferol dan asam askorbat dikarenakan BHT adalah antioksidan golongan monofenolik yang dapat mendonasikan atom H pada radikal bebas DPPH seperti pada reaksi di bawah ini (Hudson, 1999).



Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan dan EKKB dalam pemerangkapan radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Gambar 5.1.



Jenis antioksidan ekstrak koro benguk rase dan koro glinding



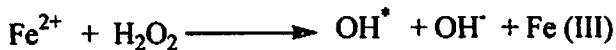
Gambar 5.1. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, EBKK, EKKG terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH

Berdasarkan diagram batang menunjukkan bahwa aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH dari EKKB konsentrasi 500 µg/mL (65,11 %) lebih besar dibanding α-tokoferol, β-karoten termasuk kategori aktivitas cukup aktif sehingga perlu diketahui berapa aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH pada 4 fraksi EKKB yang mungkin lebih tinggi aktivitas pemerangkapan radikal DPPH dibanding pada EKKB karena pada fraksi sudah terjadi pengelompokan golongan senyawa yang sejenis berdasarkan kepolarannya. Aktivitas pemerangkapan radikal DPPH dari EKKG sebesar

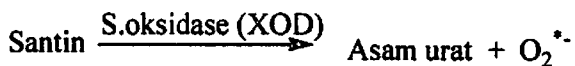
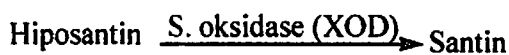
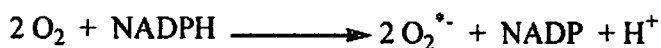
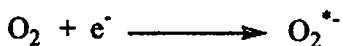
56,40 % lebih lebih besar dibanding β -karoten, tidak berbeda nyata dengan α -tokoferol termasuk kategori aktivitas cukup aktif sehingga perlu diketahui aktivitas antioksidan pada fraksi-fraksinya.

5.5.2. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion superoksida ekstrak biji kacang koro benguk rase dan koro glinding

Radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) adalah salah satu radikal yang sangat penting yang terbentuk di dalam sel aerobik akibat kebocoran rantai transpor elektron. Meskipun kurang reaktif tetapi radikal $O_2^{\cdot-}$ merupakan radikal penginisiasi dalam rangkaian oksidasi karena merupakan prekursor pembentukan radikal OH^{\cdot} yang sangat reaktif melalui reaksi Fenton dan Haber-Weiss (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

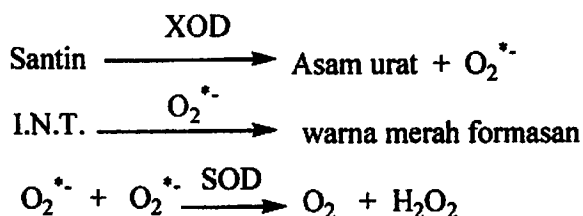


Salah satu sumber pembentukan radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$) karena proses autooksidasi Hb (pada manusia terjadi hampir 3% autooksidasi Hb perhari) menjadi metHb, di jaringan lain oksidan superoksida terbentuk oleh hasil kerja berbagai enzim seperti sitokrom P-450 reduktase, santionoksidase dan NADPH-oksidadase (dalam neutrofil pada saat kontak dengan bakteri) (Lautan, 1997; Halliwell dan Gutteridge, 1999; Papas, 1999).



Uji aktivitas peredaman suatu senyawa dilakukan secara *in vitro* dengan menguji aktivitas superoksida dismutase (SOD) yaitu mereaksikan santin dengan santin oksidase (XOD) sehingga dapat menghasilkan $O_2^{\cdot-}$ yang akan bereaksi dengan I.N.T atau 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium

klorida menghasilkan warna merah formazan. Aktivitas SOD diukur sebagai derajat aktivitas penghambatan reaksi INT dan anion superoksida ($O_2^{\bullet-}$). Satu unit SOD dapat menghambat 50 % laju reduksi INT dalam kondisi pengujian. Kemampuan meredam radikal anion superoksida diukur melalui perubahan intensitas absorbansi pada panjang gelombang λ 505 nm (Randox Laboratories Ltd, 2004).



Hasil pengujian aktivitas antioksidan ekstrak biji kacang koro (EBKK yaitu aktivitas pemerangkapan $O_2^{\bullet-}$ diuji dengan sidik ragam (lampiran 2) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap nilai SOD. Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada tabel 5.6. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan ditampilkan pada gambar 5.2.

Tabel 5.6. Rataan dan UJBD jenis antioksidan ekstrak biji kacang koro bengkok rase, koro glinding dan level konsentrasi terhadap nilai SOD

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	43,80 a B	55,2 b A	80,20 c B
Karoten	41,20 a B	73,80 b B	113,30 c C
BHT	121,90 a C	206,8 b C	446,70 c F
BHA	125,20 a C	203,4 b C	243,60 c D
Ekstrak kacang koro bengkok rase	175,50 a D	264,9 b D	382,60 c E
Ekstrak koro glinding	34,34 a A	50,23 b A	52,23 b A

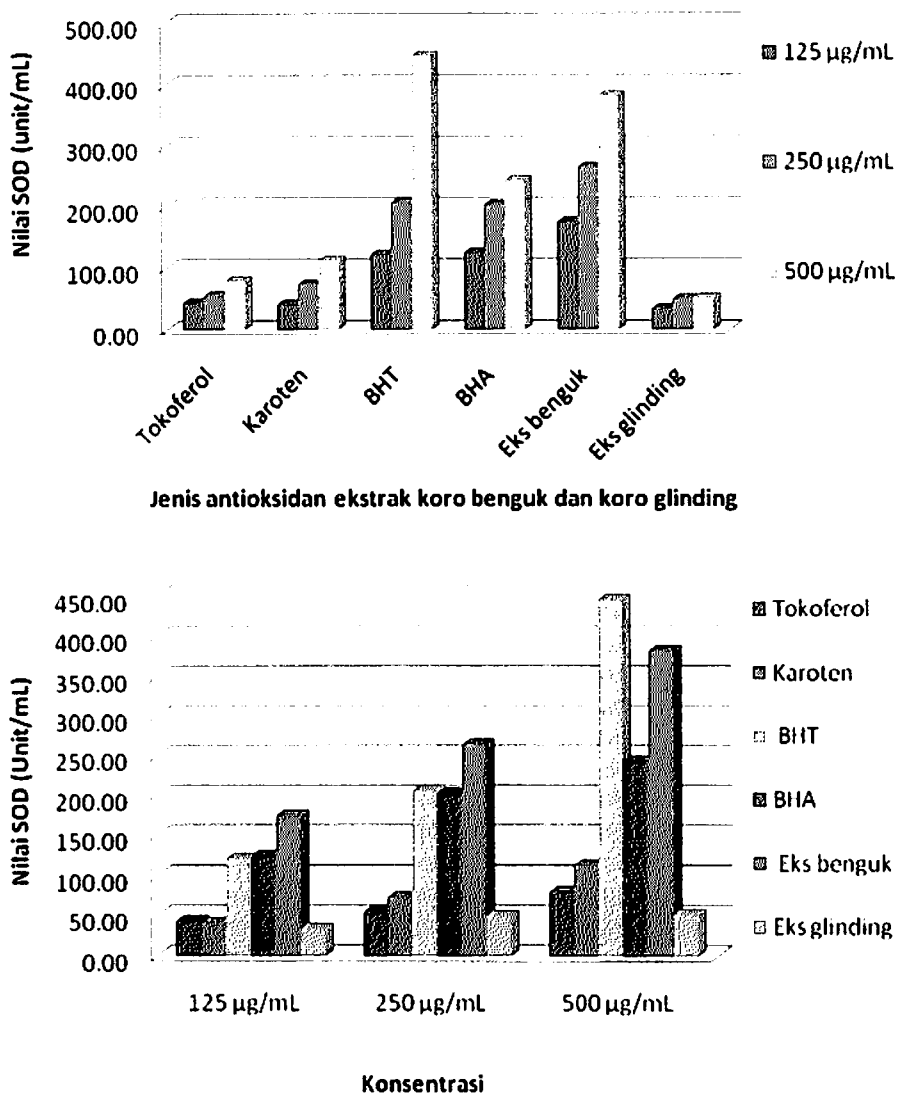
Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Dari hasil UJBD menunjukkan semakin tinggi konsentrasi jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, β -karoten, BHT, BHA. Ekstrak biji kacang koro (EKKB) semakin tinggi pula aktivitas pemerangkapan radikal bebas anion superoksida. Jenis antioksidan BHT pada konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ menunjukkan nilai SOD tertinggi kemudian kemudian EKKB, BHA β -karoten tokoferol dan nilai terendah adalah ekstrak koro glinding (EKKG).

Senyawa-senyawa yang terkandung dalam EKKB berdasarkan uji fitokimia mengandung dalam kadar tinggi flavonoid dan tanin, mengandung dalam kadar cukup yaitu fenol, steroid dan alkaloid, mengandung saponin, terpenoid dalam kadar rendah. EKKB menunjukkan lebih tinggi dibanding BHA, tokoferol dan karoten tetapi lebih rendah dibanding BHT dalam memerangkap radikal bebas anion superoksida, hal ini diduga karena EKKB berdasar uji fitokimia mengandung flavonoid dengan kadar tinggi hal ini sesuai Hall dan Cuppet (1997) bahwa flavonoid adalah senyawa turunan fenol yang terkandung dalam berbagai jenis tumbuhan dan memiliki aktivitas antioksidan. Dalam EKKB juga mengandung senyawa fenol dalam kadar cukup, fenol termasuk monofenol, difenol dan trifenol maupun polifenol memiliki aktivitas antioksidan, sebagian besar antioksidan golongan fenol setelah mengalami oksidasi tetap memiliki aktivitas antioksidan (Hudson, 1999; Pokorny *et al.*, 2001). EKKG menunjukkan memiliki aktivitas pemerangkapan radikal anion superoksida (nilai SOD) sebesar 52,23 Unit/mL pada konsentrasi 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EKKG memiliki nilai SOD terendah pada semua konsentrasi hal ini dikarenakan berdasar hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa EKKG mengandung fenol dalam jumlah sedikit (+) serta jumlah flavonoid dalam kadar sedang (++)

Flavonoid terbentuk dalam tumbuhan berasal dari asam amino aromatik fenilalanin dan tirosin dan malonat. Terdapat beberapa kelas flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yaitu flavon, flavanon, isoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3 ol, dan antosianin (Pieta, 2000; Friedli, 2000). Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH dari EBKK lebih rendah dibanding BHT dikarenakan dalam EKKB masih terdapat berbagai senyawa lain yang tidak atau kurang memiliki aktivitas antioksidan antara lain tanin, saponin, terpenoid, steroid, alkaloid.

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan dan EBKK dan EKKG dalam pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD) dapat dilihat pada Gambar 5.2.



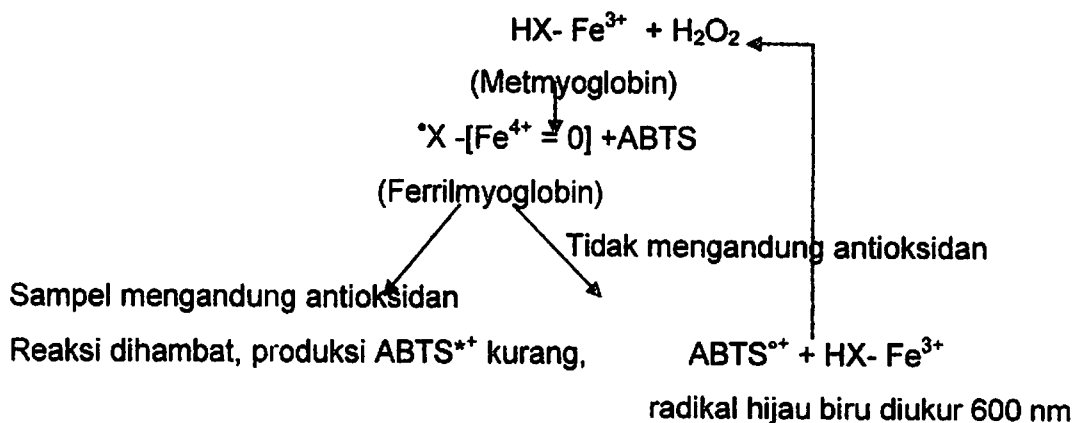
Gambar 5.2. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, EKKB, EKKG terhadap nilai SOD

Berdasarkan diagram batang menunjukkan bahwa nilai SOD dari EKKB cukup tinggi dibanding α -tokoferol, asam askorbat sehingga perlu diketahui berapa nilai SOD dari 4 fraksi EKKB yang mungkin lebih tinggi aktivitas pemerangkapan radikal anion superoksida (nilai SOD) dibanding pada EBKK karena pada fraksi sudah terjadi pengelompokan golongan senyawa yang sejenis berdasarkan kepolarannya. Nilai SOD pada EKKG paling rendah dibanding antioksidan BHT, BHA, karoten, tokoferol dan EKKB.

Berdasarkan hasil uji aktivitas pemerangkapan radikal DPPH, nilai SOD dari EKKG menunjukkan bahwa EKKG memiliki aktivitas pemerangkapan radikal DPPH cukup aktif, sehingga perlu diketahui aktivitas dari fraksi-fraksi EKKG dibandingkan fraksi-fraksi EKKB. Parameter yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi EKKB dan EKKG adalah nilai SAT dan nilai SOD.

5.5.3. Aktivitas status antioksidan total (SAT) fraksi biji koro benguk rase dan koro glinding

Sistem pertahanan antioksidan memiliki banyak komponen, defisiensi salah satu komponen dapat menyebabkan reduksi status antioksidan secara keseluruhan. Reduksi status antioksidan total dapat menyebabkan beberapa jenis penyakit seperti kanker, penyakit jantung dan penyakit degeneratif lainnya. Aktivitas atau potensi antioksidan dari suatu bahan makanan, dalam penelitian ini yaitu kacang koro benguk rase dan koro glinding diukur secara *in vitro* dengan menggunakan suatu senyawa radikal sintetik yaitu ABTS (2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulphonate) yang diinkubasikan dengan peroksidase (metmyoglobin) dan hidrogen peroksida (H_2O_2) akan menghasilkan radikal kation $ABTS^{•+}$ berwarna hijau kebiruan dan dapat dideteksi pada panjang gelombang 600 nm. Adanya antioksidan pada sampel akan menyebabkan mereduksi pembentukan warna yang menandakan aktivitas penghambatan atau peredaman radikal kation $ABTS^{•+}$. Sistem ini terdiri atas dua reagen dan dapat digunakan untuk mengukur potensi antioksidan dari obat atau makanan (Randox Laboratories, 2004).



Status Antioksidan Total (SAT) adalah parameter yang menggambarkan keadaan sistem antioksidan tubuh, sampel makanan, minuman secara keseluruhan, baik antioksidan enzimatik maupun antioksidan non enzimatik. Sistem antioksidan enzimatik antara lain terdiri dari enzim superoksida dismutase (SOD), enzim glutathione peroksidase (GPx), dan enzim katalase (CAT), sedangkan antioksidan non enzimatik yaitu vitamin C, vitamin E, beta karoten, dan senyawa-senyawa fenolik, seperti flavonoid, asam fenolat, dan tanin (Wijaya, 1996).. Adanya penurunan dari salah satu komponen sistem antioksidan tersebut akan menyebabkan penurunan SAT di dalam tubuh, sampel makanan/minuman. Apabila tubuh kekurangan SAT dibutuhkan asupan makanan yang dapat menjaga keseimbangan atau bahkan meningkatkan status antioksidan dalam tubuh.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi biji kacang koro bengkok rase (FBKK) dan fraksi biji kacang koro glinding (FKKG) yaitu nilai SAT diuji dengan sidik ragam (lampiran 3) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap nilai SOD. Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % untuk mengetahui nilai SAT tertinggi yang menunjukkan aktivitas antioksidan paling baik seperti ditampilkan pada tabel 5.7. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan ditampilkan pada Gambar 5.3.

Tabel 5.7. Rataan dan UJBD jenis antioksidan ekstrak biji kacang koro benguk rase, koro glinding dan level konsentrasi terhadap nilai SAT

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	0,4300 a E	0,7000 b C	1,7233 c E
Karoten	0,0267 a A	0,1367 b A	0,2333 c A
BHT	0,8367 a G	1,2867 b E	3,9600 c G
BHA	1,0633 a H	2,2900 b F	5,8767 c H
F.hexan benguk rase	0,1200 a B	0,2267 b B	0,6733 c B
F.etil benguk rase	0,6833 a F	1,3167 b E	2,2800 c F
F. butanol benguk rase	1,5133 a I	3,0667 b G	6,0900 c I
F. air benguk rase	0,3533 a D	0,7600 b D	1,4367 c C
F. hexan koro glinding	0,0767 a AB	0,1400 b A	0,1933 c A
F.etil koro glinding	0,1233 a B	0,1667 b A	0,2467 c A
F.butanol koro glinding	0,2667 a C	0,6733 C	1,5900 c D
F. air koro glinding	0,0967 a B	0,1667 b A	0,2833 c A

Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

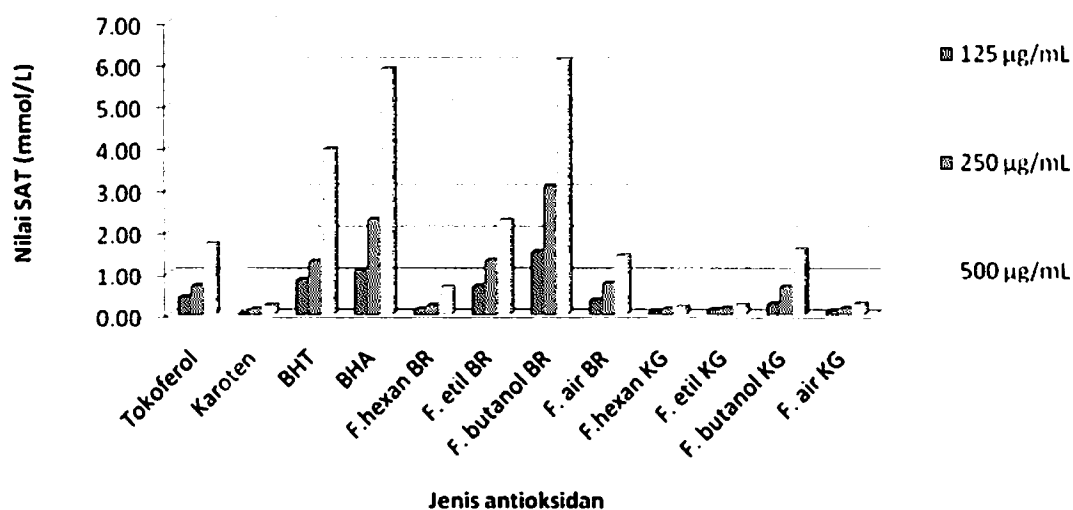
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, semakin tinggi aktivitas SAT, hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi kadar antioksidan, senyawa aktif antioksidan yang terdapat dalam dalam fraksi dan antioksidan sintesis. Kadar total fenol dalam makanan berkorelasi kuat terhadap nilai SAT.

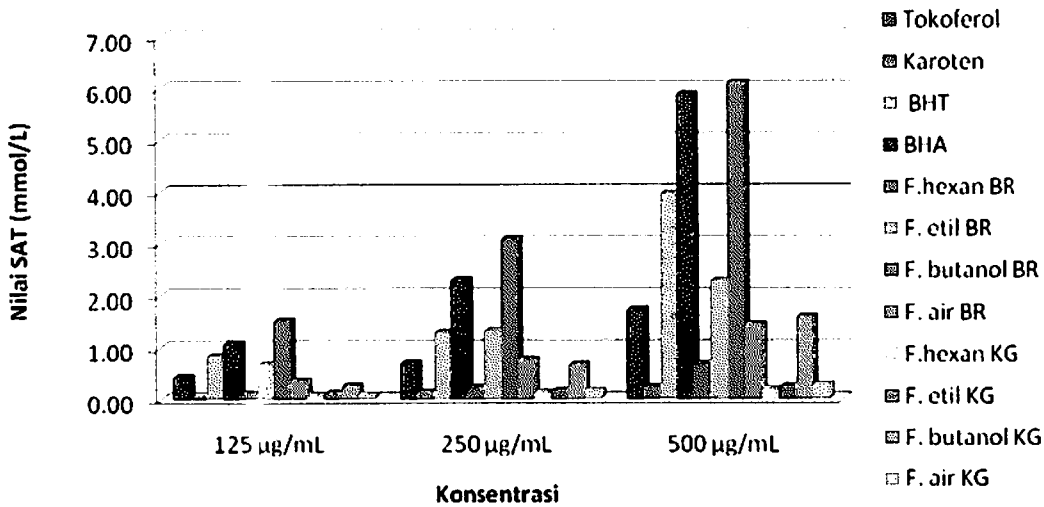
Perbedaan nilai SAT atau tinggi rendahnya nilai SAT yang dihasilkan dari 2 jenis kacang koro, menunjukkan bahwa kandungan senyawa-senyawa antioksidan pada setiap spesies koro memiliki kadar dan struktur dari senyawa-senyawa berbeda, sehingga menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda pula. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kandungan senyawa-senyawa yang menghasilkan aktivitas antioksidan pada koro benguk rase

khususnya fraksi butanol, lebih banyak dibanding fraksi-fraksi lain baik dalam koro benguk rase maupun koro glinding, sehingga lebih aktif dalam menghambat atau meredam radikal kation $ABTS^{\bullet+}$.

Aktivitas SAT tertinggi pada semua konsentrasi adalah faksi butanol benguk rase, lebih tinggi dibanding antioksidan BHA, BHT serta fraksi lain dari benguk rase. Aktivitas fraksi etil asetat benguk rase pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ sebesar 2,28 mmol/L lebih besar dibanding antioksidan tokoferol dan karoten tetapi lebih rendah dibanding BHA, BHT. Aktivitas SAT pada fraksi-fraksi biji kacang koro glinding lebih rendah dibanding fraksi-fraksi benguk rase. Aktivitas SAT pada fraksi butanol paling tinggi selanjutnya fraksi etil asetat benguk rase diduga karena fraksi butanol dan fraksi etil asetat mengandung senyawa fenol dalam kadar cukup banyak (++) dan kadar flavonoid dalam kadar banyak (+++) sehingga fraksi butanol menunjukkan aktivitas SAT lebih tinggi dibanding fraksi lain. Aktivitas SAT pada fraksi-fraksi kacang koro glinding lebih rendah dibanding fraksi-fraksi koro benguk rase dikarenakan kandungan golongan senyawa fenol dalam kadar sedikit (+), sedangkan fraksi butanol koro glinding paling tinggi dibanding fraksi-fraksi lain koro glinding tetapi lebih rendah dibanding fraksi butanol benguk rase dikarenakan fraksi butanol koro glinding mengandung senyawa flavonoid dalam kadar cukup (++).

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK dan FKKG dalam status antioksidan total dapat dilihat pada Gambar 5.3.





Gambar 5.3. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FKKB, FKGG terhadap nilai SAT

5.4.4. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion Superoksida (nilai SOD) fraksi biji koro benguk rase dan koro glinding

Radikal bebas superoksida ($O_2^{\cdot-}$) dapat mengurangi aktivitas enzim antioksidan yang lain seperti katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx). Pada bakteri *E. coli* beberapa enzim menjadi target oleh $O_2^{\cdot-}$ antara lain 6-fosfoglukonat dehidratase, akonitase, fumarase, dihidroksiasid dehidratase (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Setiap jenis tanaman dan bagian tanaman memiliki aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion superoksida yang berbeda, berdasarkan hasil penelitian Safitri (2002) ekstrak daun singkong memiliki aktivitas pemerangkapan radikal bebas $O_2^{\cdot-}$ sebesar 72,6%, buah pala sebesar 78,7%, buah dan daun jambu biji sebesar 100 %, biji jambu sebesar 87,9% dan bunga cempaka sebesar 98,3%.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi biji koro benguk rase (FKKB) dan fraksi biji koro glinding (FKKG) yaitu aktivitas pemerangkapan radikal bebas anion superoksida atau nilai SOD diuji dengan sidik ragam (lampiran 4) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap nilai SOD. Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.8. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan dari fraksi biji kacang koro ditampilkan pada Gambar 5.4.

Tabel 5.8. Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro benguk rase, koro glinding dan level konsentrasi terhadap nilai SOD

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	43,80 a D	55,0 b B	80,20 c AB
Karoten	41,20 a CD	73,80 b C	113,30 c B
BHT	121,90 a E	206,80 b D	446,70 c E
BHA	125,20 a E	203,40 b D	243,60 c D
F. hexan benguk rase	38,70 a BC	70,60 b C	164,10 c C
F. etil benguk rase	224,00 a H	402,50 b G	552,20 c G
F. butanol benguk rase	171,80 a G	384,10 b F	1278,20 b H
F. air benguk rase	154,20 a F	302,30 b E	503,8 c F
F. hexan koro glinding	28,70 a A	35,08 a A	45,46 b A
F. etil koro glinding	39,12 a B	51,97 b B	61,90 c AB
F. butanol koro glinding	43,95 a D	53,71 b B	77,84 c AB
F. air koro glinding	36,64 a B	50,81 b B	63,08 c AB

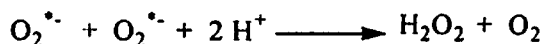
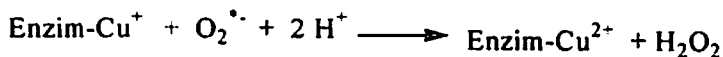
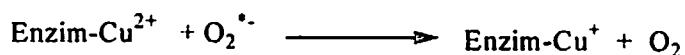
Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Dari hasil UJBD menunjukkan semakin tinggi konsentrasi jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, karoten, BHT, BHA dan fraksi biji koro benguk rase (FKKB), fraksi koro glinding (FKKG) semakin tinggi pula nilai SOD. Jenis antioksidan fraksi butanol FKKB pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan nilai SOD tertinggi kemudian fraksi etil asetat benguk rase, fraksi air benguk rase, BHT, BHA, fraksi hexan benguk rase, karoten, α -tokoferol serta semua fraksi koro glinding. Berdasarkan uji pemerangkapan radikal anion superoksida (nilai SOD) menunjukkan bahwa semua fraksi biji koro glinding memiliki nilai SOD sangat rendah jauh dibawah fraksi-fraksi koro benguk rase. Fraksi butanol dan fraksi etil asetat benguk rase memiliki nilai SOD tertinggi pada semua konsentrasi hal ini dikarenakan fraksi butanol dan fraksi etil asetat benguk rase

mengandung golongan senyawa flavonoid dan fenol dalam kadar banyak (+++). Fraksi-fraksi biji koro glinding mengandung fenol dan flavonoid dalam kadar sedang dan sedikit.

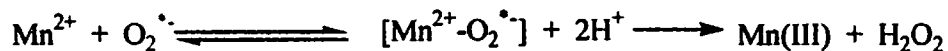
Fraksi butanol dan etil asetat benguk rase menunjukkan aktivitas SOD yang tinggi berdasarkan hasil uji fitokimia mengandung senyawa antioksidan antara lain fenol (++) dan flavonoid (+++) hal ini sesuai dengan hasil penelitian Safitri (2002) bahwa. golongan-golongan senyawa yang memiliki aktivitas superoksida desmutase (SOD) pada ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) adalah golongan senyawa yang terkait flavonoid yaitu : 1). Senyawa 1 : 7,11b-dihidrobenz[b]indeno[1,2-d]piran-3,6a,9,10(6H)-tetrol (brazilin); 2). Senyawa 2 : isomer brazilin; 3). Senyawa : 1',4'-dihidrospiro[benzofuran-3(2H),3'-[3H-2]benzopiran]-1',6', 6',7'-tetrol; 4). Senyawa 4 : 3-[[4,5dihidroksi-2-(hidroksimetil)fenil]metil]-2-3-dihidro-3,6-benzofurandiol memiliki aktivitas pemerangkapan radikal anionsuperoksida sebesar 100 % pada konsentrasi 125 µg/mL, 250 µg/mL dan konsentrasi 500 µg/mL sedangkan senyawa 5 yaitu 7S- dan 7R-protosapanin B. memiliki aktivitas SOD sebesar 100 % pada konsentrasi 500 µg/mL sedangkan konsentrasi 250 µg/mL memiliki nilai SOD sebesar 81,0767 % dan konsentrasi 125 µg/mL memiliki nilai SOD sebesar 69,2960 % (Safitri, 2002).

CuZnSOD terdapat dalam sel eukariotik, pada sel hewan CuZnSOD terdapat dalam sitosol tetapi juga terdapat dalam lisosom, nukleus, lapisan membran mitokondria, peroksisom. Enzim CuZnSOD dapat diisolasi dari eukariotik, memiliki berat molekul sekitar 32.000 dan mengandung 2 subunit protein, dimana masing-masing tempat aktif mengandung ion Cu dan ion Zn. Enzim CuZnSOD mengkatalisa dan mempercepat reaksi dismutase $O_2^{\bullet -}$. Ion Cu dalam CuZnSOD berfungsi dalam dismutase seperti pada reaksi :

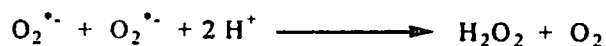
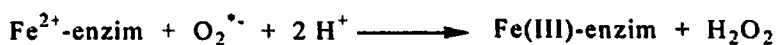


Zn^{2+} tidak berfungsi untuk mengkatalisis reaksi tetapi membantu menstabilkan enzim, Ion Cu^{2+} dapat digantikan ion Co^{2+} dan reaksi katalisa anion superoksida ($O_2^{\bullet -}$) tetap dapat berjalan sedangkan ion Mn^{2+} tidak dapat

menggantikan Cu^{2+} . CuZnSOD dapat dihambat oleh sianida, inkubasi dengan dietilditiokarbamat, tetapi hasil isolasi SOD dari *E. Coli* tidak sama dengan CuZnSOD yang tidak dapat dihambat oleh sianida dan dietilditiokarbamat memiliki berat molekul 40.000, rusak oleh kloroform dan etanol, tempat aktif mengandung Mn (III) adalah bukan CuZnSOD tetapi MnSOD yang dapat mengkatalisa reaksi seperti CuZnSOD.

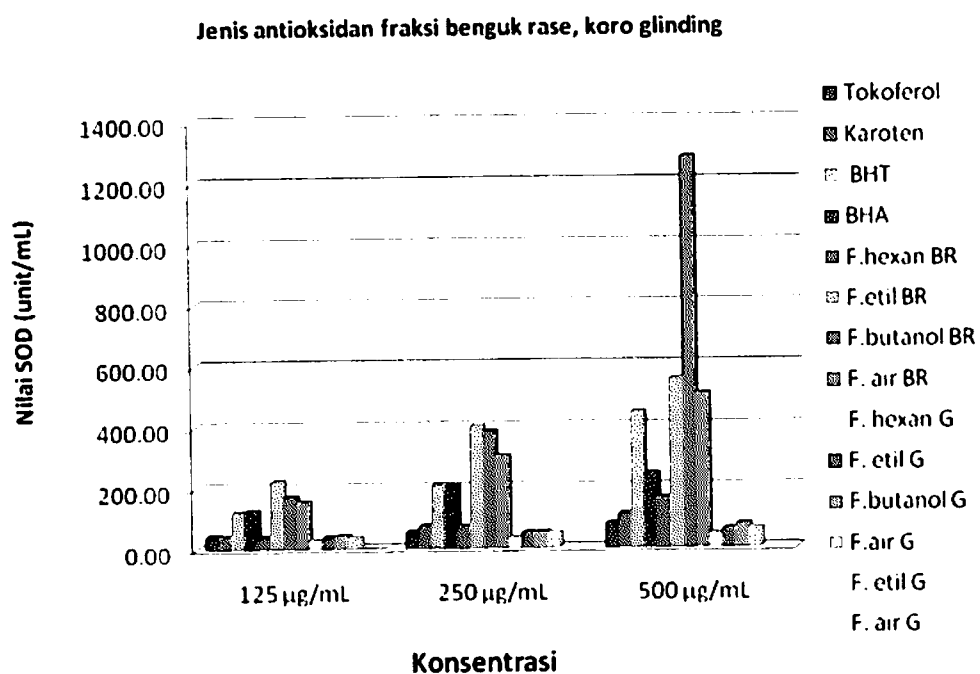
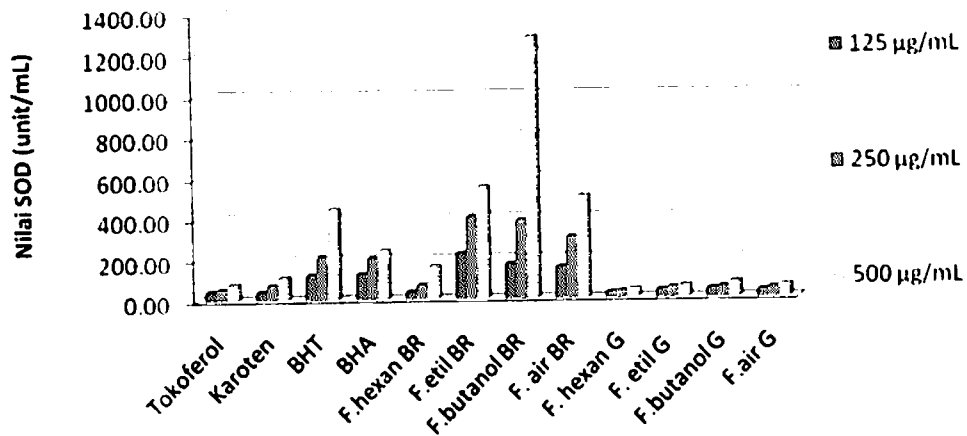


MnSOD banyak terdapat di dalam bakteri, tanaman dan hewan yaitu di mitokondria. Aktivitas MnSOD dan ZnSOD tergantung pada jaringan, jenis spesies dan jumlah atau kadar dalam mitokondria, seperti kurang lebih 10 % MnSOD dari total SOD pada tikus terdapat dalam liver. Jamur *Dactylum dendroides* memiliki aktivitas SOD sebesar 80 % dari CuZnSOD dan 20 % MnSOD. Pada beberapa jenis *crustacea*, MnSOD terdapat dalam mitokondria sedangkan pada kepiting *Callinectes sapidus* terdapat dalam mitokondria dan sitosol tetapi tidak mengandung CuZnSOD (Halliwell dan Gutteridge, 1999; Papas, 1999). MnSOD pada organisme tingkat tinggi biasanya mengandung 4 subunit protein dan memiliki 0,5 atau 1 ion Mn setiap unit. Jenis SOD yang lain dapat diisolasi dari *E. coli* adalah FeSOD terdapat dalam beberapa jenis bakteri, ganggang dan tanaman tingkat tinggi. FeSOD biasanya mengandung 2 subunit protein. Reaksi katalisa dari FeSOD sebagai berikut :



Tidak ada jaringan hewan yang mengandung FeSOD tetapi tanaman tingkat tinggi mengandung FeSOD (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK dan FKKG dalam status antioksidan total dapat dilihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FKKB, FKGG terhadap nilai SOD

Berdasarkan hasil penelitian pada ekstrak koro benguk rase dan koro glinding dengan parameter antioksidan pemerangkapan radikal DPPH, nilai SOD serta fraksi koro benguk rase dan koro glinding menunjukkan bahwa koro glinding tidak aktif sebagai antioksidan, sehingga penelitian dilanjutkan pada fraksi-fraksi biji koro benguk rase dengan parameter pemerangkapan radikal DPPH, pemerangkapan radikal *OH dan aktivitas katalase (CAT).

5.5.5. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH fraksi biji kacang koro benguk rase

Pengujian aktivitas antioksidan yaitu pemerangkapan radikal bebas DPPH, aktivitas pemerangkapan radikal bebas *OH dan aktivitas enzim katalase (CAT) dilakukan terhadap fraksi-fraksi dari ekstrak biji kacang koro benguk rase (FKKB) untuk mengetahui keberadaan komponen antioksidan pada fraksi polar, semi polar atau non polar. Komponen-komponen dalam biji kacang koro benguk rase terlarut dalam jenis pelarut yang berbeda, lemak larut dalam pelarut non polar, sedangkan protein dan senyawa fenolik larut dalam pelarut polar (Pokorny *et al.*, 2001).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi biji kacang koro (FBKK) yaitu aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH diuji dengan sidik ragam (lampiran 6) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH. Kemudian dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (UJBD) pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.6. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH ditampilkan pada Gambar 5.5.

Tabel 5.9. Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji koro benguk rase dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan radikal bebas DPPH

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	500	250	125
Tokoferol	40,8227 a E	50,9499 b E	55,0479 c C
Karoten	6,4747 a A	14,352 b A	20,1813 c A
BHT	47,7190 a E	80,6772 b G	91,5754 c F
BHA	58,9686 a F	90,5308 b H	94,9132 c G
Fraksi hexan benguk rase	7,3501 a A	24,3575 b B	32,1408 c B
Fraksi etil asetat benguk rase	48,2087 a E	74,9611 b F	93,2340 c FG
Fraksi butanol benguk rase	31,0504 a B	41,8322 b C	59,5162 c D
Fraksi air benguk rase	33,5280 a C	44,8890 b D	68,6137 c E

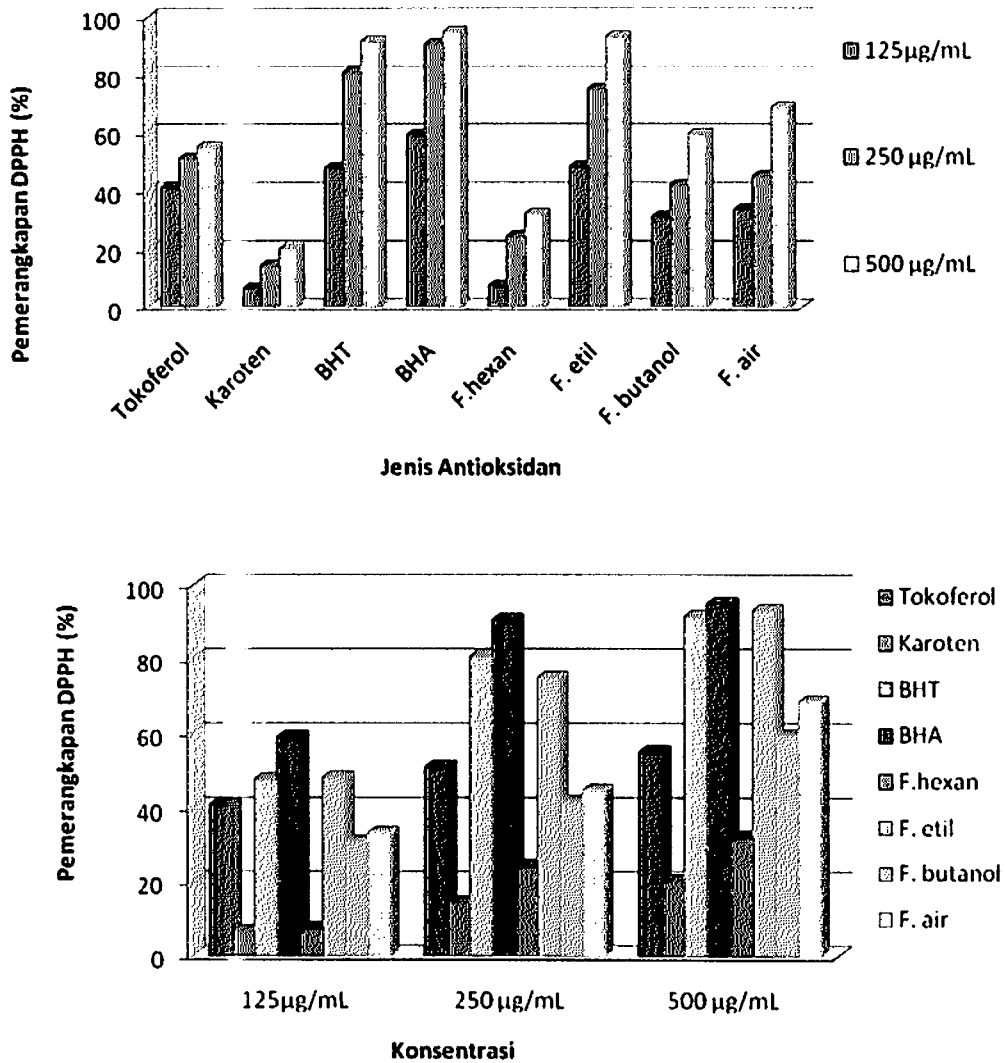
Dari hasil UJBD menunjukkan semakin tinggi konsentrasi jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, karoten, BHT, BHA dan fraksi biji kacang koro (FKKB) semakin tinggi pula kemampuannya dalam memerangkap radikal bebas DPPH. Jenis antioksidan BHA dan fraksi etil asetat benguk rase pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan pemerangkapan radikal bebas DPPH tertinggi kemudian antioksidan fraksi air. Fraksi butanol dan asam askorbat memiliki aktivitas sama dalam pemerangkapan radikal bebas DPPH dan fraksi hexan memiliki aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH paling rendah.

Konsentrasi 250 $\mu\text{g/mL}$ aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH tertinggi adalah BHT lebih tinggi dibanding fraksi etil asetat, pada konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ aktivitas BHT akhirnya dapat disusul oleh fraksi etil asetat. Konsentrasi 125 $\mu\text{g/mL}$ aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH tertinggi adalah BHT dan fraksi etil asetat.

Fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas pemerangkapan radikal bebas tertinggi sama dengan BHT dan lebih tinggi dibanding α -tokoferol, asam askorbat, fraksi air, butanol dan fraksi n-hexan. Fraksi etil asetat mengandung flavonoid dalam kadar tinggi (+++), tanin dan fenol dalam jumlah sedang (++) , steroid dan alkaloid dalam kadar rendah (+). Flavanoid diduga paling berperan dalam menyumbangkan aktivitas antioksidan dalam fraksi etila asetat. Flavanoid menurut strukturnya merupakan senyawa induk flavon , beberapa golongan flavonoid antara lain antosianin, protoantosianin, falavonol, flavon, glukoflavon, biflavonil, khlakon dan auron, flavanon, isoflavon (Harborne, 1987). Menurut Halliwel dan Gutteridge (1999) mekanisme kerja antioksidan flavonoid meliputi : 1). Menekan pembentukan radikal bebas atau ROS dengan cara menghambat enzim, pengkelatan ion logam (*metal ion chelating*) yang terlibat produksi radikal bebas; 2). Meredam radikal bebas (*free radicals scavenger*).

Fraksi etil asetat mengandung fenol menunjukkan aktivitas antioksidan pemerangkap radikal bebas DPPH lebih tinggi dibanding tokoferol. Menurut Halliwel dan Gutteridge (1999) golongan fenol memiliki gugus OH yang terdapat pada cincin benzena, banyak tanaman mengandung sejumlah besar senyawa golongan fenol. Berdasarkan hasil uji *in vitro* menunjukkan bahwa antioksidan fenol memiliki aktivitas lebih tinggi dibanding tokoferol yaitu dalam menghambat peroksidasi lipid melalui pemutusan rantai radikal bebas.

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan FKKB dalam pemerangkapan radikal bebas DPPH dapat dilihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH

Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH fraksi etil asetat konsentrasi 250 µg/mL dan 500 µg/mL termasuk kategori sangat aktif (74,96 % - 93,23 %), fraksi butanol dan fraksi air konsentrasi 500 µg/mL termasuk kategori cukup aktif (59,51 % - 68,61 %).

5.5.6. Aktivitas antioksidan katalase (CAT) fraksi biji kacang koro benguk rase

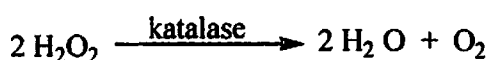
H₂O₂ akan dirubah oleh 2 jenis enzim yaitu katalase (CAT) yang akan mengkatalisa dekomposisi H₂O₂ menjadi O₂



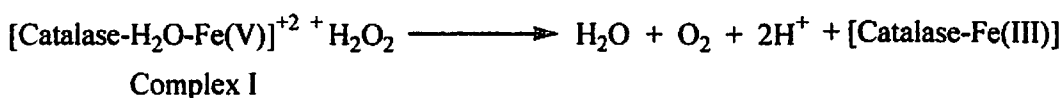
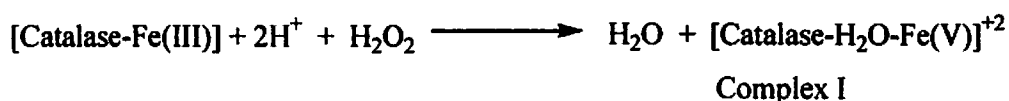
atau oleh enzim peroksidase yang akan mendekomposisi H₂O₂ dengan mengoksidasi substrat lain.



Enzim SOD adalah pertahanan garis pertama untuk melawan radikal bebas O₂⁻ yang merubah ion superoksida menjadi H₂O₂ yang masih cukup toksik terhadap sel (Kimbrough *et al.*, 1997). CAT bekerja erat dengan SOD untuk mencegah pembentukan radikal bebas yang berbahaya terhadap tubuh. SOD merubah radikal anion superoksida menjadi H₂O₂ dan CAT berperan merubah H₂O₂ menjadi air dan oksigen (Hallwell dan Gutterdige, 1999; Papas, 1999; Vitaminstuff, 2007).



Reaksi perubahan H₂O₂ mengalami oksidasi dan direduksi melalui 2 tahap reaksi melibatkan enzim CAT pada reaksi pertama 1 molekul H₂O₂ direduksi menjadi H₂O, CAT dioksidasi menjadi Complex I. Reaksi kedua molekul H₂O₂ dioksidasi sedangkan Complex I direduksi kembali menjadi CAT



CAT bereaksi secara bertahap, CAT dioksidasi oleh H₂O₂ secara *irreversible*, CAT bekerja baik pada pH 7 (Kimbrough *et al.*, 1997).

CAT diproduksi secara alami dalam tubuh makhluk hidup untuk merubah H₂O₂ menjadi air dan oksigen,serta mencegah pembentukan gelembung CO₂ dalam darah. CAT juga mengurai senyawa toksik dalam tubuh antara lain alkohol, fenol dan formaldehida (Vitamin Stuff, 2007).

Sebagian besar sel aerob memiliki aktivitas enzim CAT, seperti *Bacillus popilliae*, *Mycoplasma pneumoniae*, alga hijau *Euglena*, beberapa cacing parasit, ganggang *Gloeocapsa*. Pada hewan CAT banyak terdapat pada hampir semua organ tubuh khususnya pada liver. CAT dalam eritrosit berfungsi mendekomposisi H_2O_2 yang dihasilkan dari dismutase $O_2^{\cdot -}$ hasil autooksidase hemoglobin (Hb). Otak, jantung dan otot mengandung CAT dalam kadar rendah dibanding liver. Tanaman juga mengandung CAT yang diatur oleh beberapa gen. CAT pada hewan terdiri dari 4 subunit protein, masing-masing mengandung Fe-hem sebagai sisi tempat aktif. Setiap subunit mengandung 1 molekul NADPH. Kerusakan, penurunan aktivitas CAT pada bahan makanan menjadi subunit terjadi karena penyimpanan, pemanasan-pembekuan, terpapar asam atau basa. *E.coli* memiliki 2 jenis CAT yaitu hidroperoksidase II (HPII) adalah heksamer yang memiliki 1 hem pada setiap unit (tanpa berikatan dengan NADPH), HPII dikode oleh gen *katE*, hidroperoksidase I (HPI) dikode oleh gen *katG* merupakan tetramer memiliki aktivitas peroksidase yang luas (Halliwell dan Gutteridge, 1999). Struktur rinci dari CAT berbeda dari tiap organisme, tetapi struktur umum adalah 4 struktur yang analog dengan hemoglobin, berupa tetramer dan setiap subunit terdiri 500 unit dengan Fe dipusat porfirin. Fe pada CAT berbeda dengan Fe pada Hb yaitu Fe(II) sedangkan pada CAT adalah Fe(III). Pada reaksi Fe(III) dioksidasi menjadi Fe(V) pada reaksi oksidasi-reduksi meskipun bukti spektroskopik menunjukkan bahwa Complex I lebih mirip kation Fe(IV)-porfirin (Kimbrough *et al.*, 1997).

Struktur rinci dari CAT berbeda dari tiap organisme, tetapi struktur umum adalah 4 struktur yang analog dengan hemoglobin (Hb), berupa tetramer dan setiap subunit terdiri 500 unit dengan Fe dipusat porfirin. Fe pada CAT berbeda dengan Fe pada Hb yaitu Fe(II) sedangkan pada CAT adalah Fe(III). Pada reaksi Fe(III) dioksidasi menjadi Fe(V) pada reaksi oksidasi-reduksi meskipun bukti spektroskopik menunjukkan bahwa Complex I lebih mirip kation Fe(IV)-porfirin (Kimbrough *et al.*, 1997).

Pengukuran aktivitas CAT melalui dekomposisi H_2O_2 yang dapat diukur pada panjang gelombang 240 nm atau dengan mengukur kadar O_2 yang dibebaskan. (Mullen dan Gifford, 1993; Halliwell dan Gutteridge, 1999).

CAT telah dapat diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai bakteri, fungi dan hewan, angiospermae antara lain daun *spinach*, kotiledon mentimun, kotiledon *pumpkin*, kotiledon bunga matahari, kotiledon tanaman kapas, daun tembakau, endosperma kacang kastor (Mullen dan Gifford, 1993). CAT dikarakterisasi mengandung heme, merupakan enzim tetramerik yang secara eksklusif terdapat dalam mikrobodi (glioksisom dan peroksisom daun). Dalam glioksisom CAT mengkatalisis dekomposisi H_2O_2 yang berasal dari β -oksidasi asam lemak (Mullen dan Gifford, 1993). CAT terdapat dalam peroksisom sel untuk mencegah terbentuknya radikal $\cdot OH$ yang bersifat sangat toksik dan berbahaya yang dapat mengakibatkan mutasi DNA (Vitaminstuff, 2007).

Hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi biji kacang koro benguk rase (FKKB) yaitu aktivitas CAT diuji dengan sidik ragam (lampiran 7) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas CAT. Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.10. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan FBKK ditampilkan pada gambar 5.6.

Dari hasil UJBD menunjukkan semakin tinggi konsentrasi jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, karoten, BHT, BHA dan fraksi biji kacang koro benguk rase (FKKB) semakin tinggi pula aktivitas CAT. Katalase (CAT) terdapat di peroksisom pada hampir semua sel makhluk hidup aerob, berfungsi untuk melindungi sel dari pengaruh toksik H_2O_2 melalui katalisa dekomposisi H_2O_2 menjadi oksigen dan air tanpa menghasilkan radikal bebas (Boon *et al.*, 2001).

Tabel 5.10. Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro dan level konsentrasi terhadap aktivitas CAT

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	22.6675 a C	52.6162 b C	53.5201 b C
Karoten	15.3661 a B	23.1094 b B	23.2299 b A
BHT	23.7923 a C	50.3666 b C	59.4958 c D
BHA	49.3623 a E	50.8185 a C	60.5504 b D
Fraksi hexan benguk rase	8.8681 a A	15.2255 b A	19.4235 c A
Fraksi etil asetat benguk rase	41.5487 a D	59.2347 b E	66.3855 c E
Fraksi butanol benguk rase	41.9082 a D	54.9864 b CD	65.9436 c E
Fraksi air benguk rase	24.5656 a C	24.8268 a B	29.6475 b B

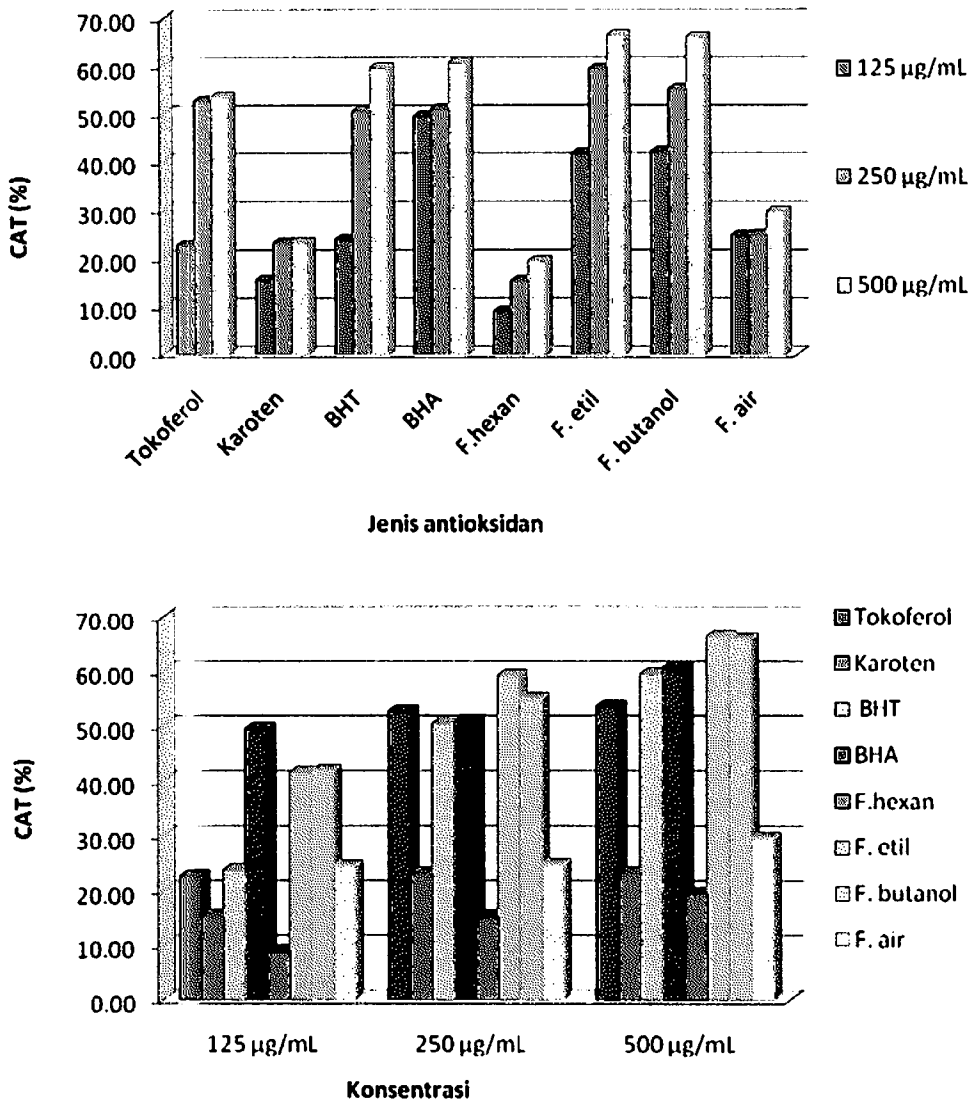
Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Fraksi etil asetat dan butanol konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ tidak berbeda nyata dan menunjukkan aktivitas CAT tertinggi, selanjutnya diikuti BHT, BHA tokoferol, fraksi air dan terendah adalah β -karoten dan fraksi hexan. Aktivitas CAT terendah adalah β -karoten dan fraksi hexan tidak, aktivitas antioksidan berdasarkan persentase peredaman dapat dikategorikan atas aktivitas kuat atau tinggi dengan aktivitas peredaman $\geq 70\%$, aktivitas sedang atau moderat dengan aktivitas $< 70\%$ dan $\geq 50\%$, aktivitas lemah $< 50\%$ dan $\geq 30\%$ dan tidak aktif bila $< 30\%$. Fraksi etil asetat, fraksi butanol, BHT dan tokoferol memiliki aktivitas CAT sedang (moderat), fraksi air, fraksi hexan dan asam askorbat memiliki aktivitas CAT tidak aktif

Biji kacang koro benguk rase memiliki aktivitas CAT untuk menetralkan H_2O_2 agar tidak menghasilkan radikal bebas $\cdot\text{OH}$ yang sangat toksik dan reaktif sehingga dapat mencegah sel dari kerusakan oksidatif sel. Aktivitas CAT pada fraksi biji kacang koro menunjukkan fraksi etil asetat, fraksi butanol memiliki aktivitas sedang meskipun lebih tinggi dibanding tokoferol, BHA BHT dan β -karoten. Aktivitas CAT bervariasi antar tanaman, bawang prey dan bawang

menunjukkan aktivitas CAT tinggi. Buah pada umumnya memiliki aktivitas CAT lebih rendah dikarenakan keasaman yang lebih besar sehingga lebih besar kecenderungan mengalami oksidasi (Kimbrough *et al.*, 1997). Hal ini sesuai hasil penelitian bahwa CAT pada biji kacang koro tidak memiliki aktivitas CAT yang tinggi.

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan FBKK terhadap aktivitas CAT dapat dilihat pada Gambar 5.6



Gambar 5.6. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas katalase (CAT)

5.5.7. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal *OH fraksi biji kacang koro benguk rase

Metoda oksidasi 2-deoksiribosa digunakan untuk mengetahui aktivitas peredaman radikal *OH yang terbentuk melalui reaksi Fenton yang selanjutnya mengoksidasi 2-deoksiribosa dan terdegradasi diantaranya menjadi malondialdehida (MDA). Reaksi Fenton adalah reaksi dekomposisi H₂O₂ yang tergantung ketersediaan garam besi. MDA dan asam tiobarbiturat pada pemanasan dengan pH rendah menghasilkan kromogen warna merah muda (pink) yang terukur pada absorbansi 532 nm. Reaksi Fenton dapat dipercepat dengan penambahan bahan pereduksi seperti asam askorbat (Gomes *et al.*, 2001).

Radikal hidroksil (OH*) dihasilkan melalui inkubasi beberapa reagen pada suhu 37⁰ C selama 60 menit yang dikenal dengan reaksi Fenton meliputi reagen 10 mM KH₂PO₄-KOH, pH 7.4, 20-100 μM Fe(SO₄)₂(NH₄)₂-EDTA, 1.42 mM H₂O₂, antioksidan and 2.8 mM deoxyribose. Produksi radikal *OH melalui reaksi Fenton secara lengkap adalah :



Radikal *OH bersifat sangat reaktif sehingga dapat merusak hampir seluruh biomolekul. Radikal *OH secara biologis dihasilkan oleh reaksi Fenton dan Haber Weiss. Oksidasi lipid oleh *OH menghasilkan karbon radikal pada molekul yang diserangnya, selanjutnya radikal ini dapat bereaksi dengan O₂ menghasilkan radikal peroksil yang memulai tahap propagasi.

Pada penelitian ini radikal *OH dihasilkan melalui reaksi Fenton dan asam askorbat yang selanjutnya menyerang gula deoksiribosa menghasilkan MDA bersama asam tiobarbiturat (TBA) pada pemanasan dan pada pH rendah akan menghasilkan kromogen merah muda yang terukur pada panjang gelombang 532 nm.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan fraksi biji kacang koro benguk rase (FKKB) yaitu aktivitas pemerangkapan radikal *OH diuji dengan sidik ragam

(lampiran 8) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas pemerangkapan radikal *OH . Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.11. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan FBKK ditampilkan pada Gambar 5.7.

Tabel 5.11. Rataan dan UJBD jenis antioksidan fraksi biji kacang koro benguk rase dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan *OH

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	64,5196 a C	76,0108 b D	79,2613 c C
Karoten	32,8520 a A	43,0893 b A	53,0438 c A
BHT	77,7537 a D	87,3716 b G	96,3423 c F
BHA	74,5933 a D	79,8564 b DE	91,1236 c E
Fraksi hexan benguk rase	30,2376 a A	47,6114 b B	52,0247 b A
Fraksi etil asetat benguk rase	65,5657 a C	81,0421 b EF	85,7322 c D
Fraksi butanol benguk rase	75,8240 a D	84,8620 b FG	98,0738 c F
Fraksi air benguk rase	52,0858 a B	62,9752 b C	63,9048 c B

Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

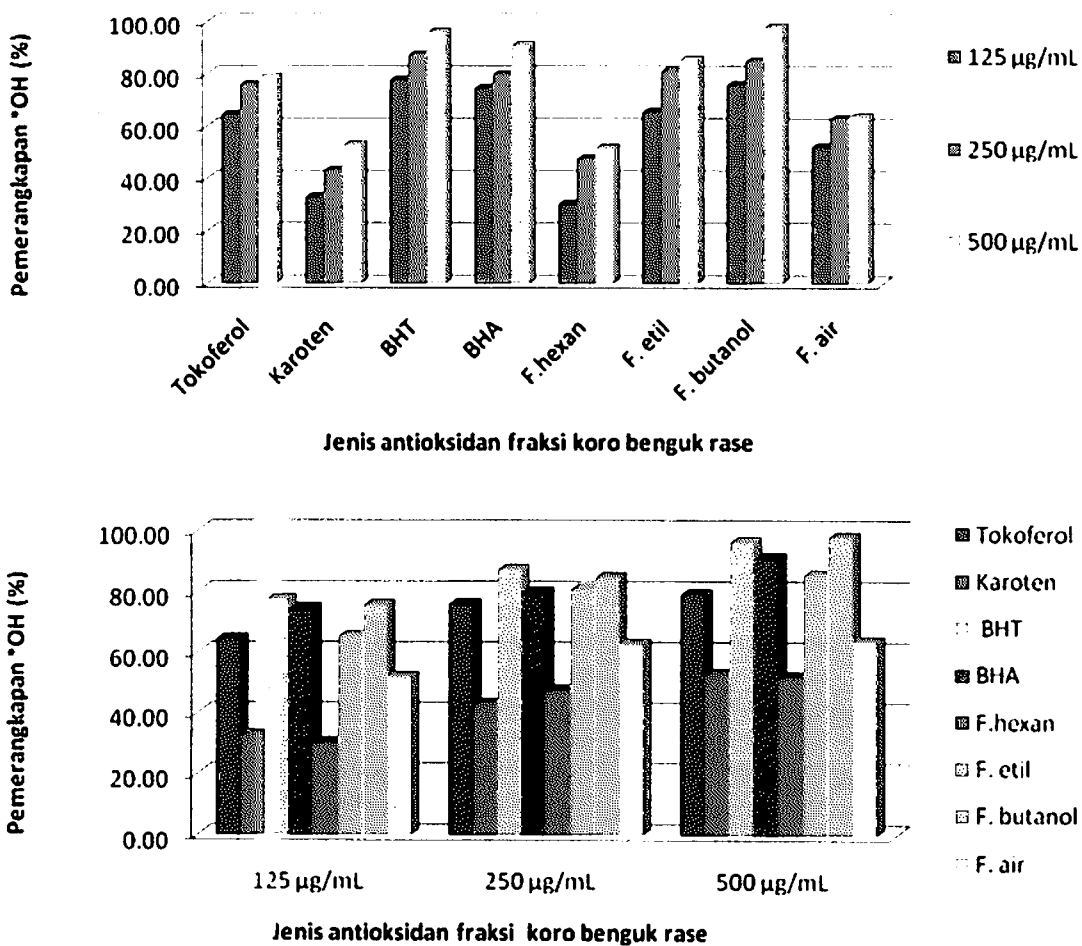
Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan semakin tinggi konsentrasi semakin besar aktivitas pemerangkapan radikal *OH hal ini dikarenakan senyawa aktif antioksidan pemerangkap radikal *OH dalam biji kacang koro semakin besar konsentrasinya. Aktivitas pemerangkap radikal *OH tertinggi pada fraksi butanol dan BHT selanjutnya BHA dan fraksi etil asetat. Aktivitas terendah dari fraksi biji koro benguk rase adalah fraksi hexan tidak berbeda nyata dengan karoten.

Aktivitas pemerangkapan radikal *OH tertinggi pada fraksi butanol dan fraksi etil asetat dikarenakan ke 2 fraksi mengandung golongan senyawa

antioksidan yaitu flavonoid dalam kadar banyak (+++) dan golongan fenol dalam kadar cukup (++)).

Aktivitas peredaman radikal bebas yang tinggi menunjukkan kemampuan mendonasikan atom hydrogen (H) secara cepat dari gugus senyawa antioksidan ke radikal bebas oksidan atau radikal bebas dapat mengabstraksi atom H dari gugus senyawa antioksidan sehingga terjadi netralisasi radikal bebas (Halliwell dan Gutteridge, 1999).

Pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan FBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal *OH dapat dilihat pada Gambar 5.7



Gambar 5.7. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antioksidan, FBKK terhadap aktivitas pemerangkapan radikal *OH

Untuk menentukan fraksi aktif antioksidan dari 4 fraksi kacang koro benguk rase dapat dilihat berdasarkan aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH, nilai SOD, nilai SAT, aktivitas CAT, aktivitas

pemerangkapan radikal *OH dari ekstrak, fraksi n-hexan, etil asetat, butanol dan fraksi air dapat dilihat pada Tabel 5.12.

Tabel 5.12 Aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi biji kacang koro bengkok rase

Uji	Fraksi	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
		500	250	125
DPPH	Tokoferol	++	++	+
	Karoten	-	-	-
	BHA	+++	+++	++
	BHT	+++	+++	+
	Ekstrak	++	++	+
	F.hexan	+	-	-
	F.etil asetat	+++	+++	+
	F.butanol	++	+	+
	F. air	++	+	+
SOD	Tokoferol	-	-	-
	Karoten	-	-	-
	BHA	+	+	-
	BHT	++	+	-
	Ekstrak	++	+	-
	F.hexan	+	-	-
	F.etil asetat	+++	++	+
	F.butanol	+++	++	-
	F. butanol	+++	+	-
CAT	Tokoferol	++	++	-
	Karoten	-	-	-
	BHA	++	++	-
	BHT	++	++	++
	F.hexan	++	++	+
	F.etil asetat	++	++	+
	F.butanol	++	++	-
	F. air	++	++	-
OH	Tokoferol	+++	+++	++
	Karoten	++	+	+
	BHA	+++	+++	+++
	BHT	+++	+++	+++
	F.hexan	++	+	+
	F.etil asetat	+++	+++	++
	F.butanol	+++	+++	+++
	F. air	++	++	++
SAT	Tokoferol	+	-	-
	Karoten	-	-	-
	BHA	-	+	+++
	BHT	-	-	++
	F.hexan	-	-	-
	F.etil asetat	-	-	+
	F. butanol	+	++	+++
	F. air	-	-	-

Keterangan : aktivitas DPPH atau CAT

- +++ (sangat aktif) $E \geq 70 \%$
- ++ (cukup aktif) $70 \% > E \geq 50 \%$,
- + (lemah) $50 \% > E \geq 30 \%$
- (tidak aktif) $E < 30 \%$

Keterangan : nilai SOD

- +++ (tinggi) $E \geq 500 \text{ unit/mL}$
- ++ (cukup tinggi) $500 > E \geq 350 \text{ unit/mL}$
- + (rendah) $350 > E \geq 200 \text{ unit/mL}$
- (sangat rendah) $E < 200 \text{ unit/mL}$

Keterangan : nilai SAT

- +++ (tinggi) $E \geq 4,5 \text{ mmol/L}$
- ++ (cukup tinggi) $4,5 > E \geq 3,0 \text{ mmol/L}$
- + (rendah) $3,0 > E \geq 1,5 \text{ mmol/L}$
- (sangat rendah) $E < 1,5 \text{ mmol/L}$

Berdasarkan hasil evaluasi aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH fraksi aktif adalah fraksi etil asetat, berdasarkan nilai SOD fraksi etil asetat adalah fraksi aktif kemudian fraksi butanol dan fraksi air, berdasarkan aktivitas CAT fraksi aktif adalah fraksi etil asetat dan fraksi butanol, berdasarkan aktivitas status antioksidan total adalah fraksi butanol, berdasarkan aktivitas pemerangkapan radikal *Oh adalah fraksi etil asetat dan fraksi butanol. Untuk bahan pengujian fraksi aktif antioksidan yang digunakan uji in vivo pada tikus diabetik adalah fraksi etil asetat dan fraksi butanol.

5.5.8. Aktivitas antidiabetes ekstrak dan fraksi biji kacang koro benguk rase, koro glinding

Bentuk monosakarida seperti glukosa, fruktosa yang dapat ditranspora dari lumen usus ke dalam aliran darah, sehingga zat tepung kompleks, oligisakarida, dan disakarida harus diuraikan menjadi molekul monosakarida sebelum diabsorpsi di dalam duodenum dan jejunum bagian atas. Penyerapan akan dipermudah oleh enzim α -amylase, α -glukosidase yang menempel pada *brush border* sel usus. Penghambatan enzim α -glukosidase dapat meminimalkan pencernaan usus bagian atas dan menunda pencernaan dan absorpsi zat tepung, disakarida yang masuk pada usus kecil bagian distal sehingga menurunkan glikemik setelah makan sebanyak 45 – 60 mg/dL dan

dapat menciptakan efek hemat insulin. Monoterapi menggunakan obat penghambat α -glukosidase dapat memberikan efek penurunan sedang yaitu penurunan glycohaemoglobin sebesar 0,5 – 1 % dan penurunan kadar glukosa puasa sebesar 20 – 25 mg/dL. Bahan penghambat α -glukosidase diantaranya adalah bahan aktif berupa acarbose yang diberikan dalam dosis 25 – 100 mg sebelum suapan pertama setiap waktu makan (Katzung, 2002).

Penelitian antidiabetes menggunakan parameter penghambatan enzim α -glukosidase dari ekstrak, fraksi-fraksi biji kacang koro benguk rase, kacang koro glinding dibandingkan obat yang memiliki aktivitas inhibisi α -glukosidase yaitu glucobasy yang mengandung senyawa aktif acorbase.

Prinsip penelitian penghambatan α -glukosidase adalah

p. nitrofenil + enzim $\xrightarrow{\text{Na}_2\text{CO}_3}$ p-nitrofenil (kuning) + glukosa

Substrat + enzim \longrightarrow SE (kuning)

Apabila sampel mengandung enzim penghambatan α -glukosidase maka tidak terbentuk SE sehingga memberikan menekan pembentukan warna kuning. Pengukuran menggunakan absorbansi pada panjang gelombang 400 nm.

Hasil pengujian aktivitas antidiabetes penghambatan enzim α -glukosidase dari ekstrak, fraksi biji kacang koro benguk rase dan ekstrak, fraksi biji kacang koro glinding diuji dengan sidik ragam (lampiran 10) menunjukkan terdapat pengaruh interaksi yang sangat nyata antara jenis antioksidan dan konsentrasi ($P < 0,01$) terhadap aktivitas penghambatan α -glukosidase . Kemudian dilanjutkan dengan UJBD pada taraf 5 % seperti ditampilkan pada Tabel 5.13. dan diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antidiabetes ditampilkan pada Gambar 5.8.

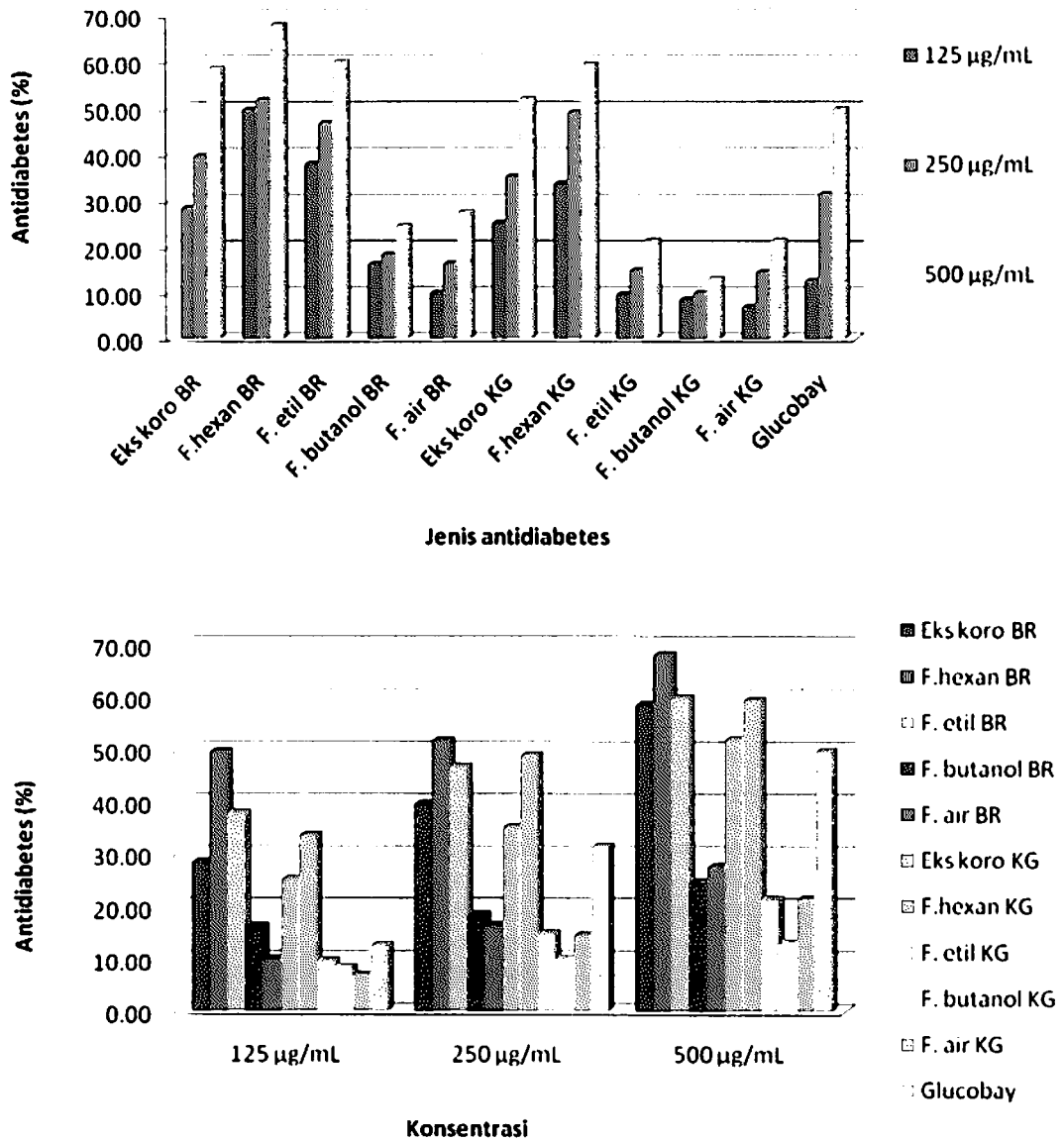
Tabel 5.13. Rataan dan UJBD jenis antidiabetes ekstrak, fraksi biji kacang koro benguk rase, ekstrak, fraksi biji kacang koro glinding dan level konsentrasi terhadap pemerangkapan penghambatan α -glukosidase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Glucobasy	12,5921 a B	31,4626 b C	49,7019 c D
Eks koro benguk rase	28,3692 a E	39,5205 b D	58,4548 c E
F.hexan benguk rase	49,5226 a H	51,6277 a F	67,9242 b F
F.etil benguk rase	37,8592 a G	46,6666 b E	59,7982 c E
F. butanol benguk rase	16,1180 a C	18,3014 a B	24,5572 b BC
F. air benguk rase	9,9161 a AB	16,3163 b B	27,5247 c C
Eks koro glinding	25,1032 a D	35,1215 b CD	51,9257 c D
F. hexan koro glinding	33,5855 a F	48,8996 b EF	59,3306 E
F.etil koro glinding	9,6286 a AB	14,8785 b B	21,3434 c B
F.butanol koro glinding	8,4594 A	9,9954 b A	13,0903 c A
F. air koro glinding	6,9001 a A	14,4887 b AB	21,3664 c B

Keterangan : Huruf kecil yang sama pada baris dan huruf besar yang sama pada kolom menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan fraksi hexan benguk rase konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ memiliki aktivitas penghambatan α -glukosidase paling besar dibanding fraksi-fraksi lainnya baik fraksi biji koro benguk rase maupun koro glinding dan obat glucobasy. Penghambat α -glukosidase berikutnya adalah fraksi etil asetat koro benguk rase dan fraksi hexan koro glinding.

Pengaruh konsentrasi dan jenis antidiabetes ekstrak, fraksi biji kacang koro benguk rase dan kacang koro glinding dapat dilihat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8. Diagram batang pengaruh konsentrasi dan jenis antidiabetes ekstrak, fraksi biji kacang koro benguk rase, koro glinding

Fraksi hexan koro benguk rase sebagai fraksi aktif antidiabetes penghambatan α -glukosidase berdasarkan uji fitokimia mengandung golongan senyawa flavonoid, fenol, terpenoid, steroid dalam kadar sedikit (+). Untuk mengetahui secara pasti senyawa yang berperan aktif sebagai antidiabetes perlu penelitian lebih lanjut yaitu isolasi senyawa dari fraksi aktif antidiabetes sehingga dapat diketahui struktur kimia dan mekanisme kerja inhibisi α -glukosidase.

BAB VI

KESIMPULAN

1. Biji kacang koro benguk rase rata-rata mengandung air sebesar 9,123 %; abu sebesar 3,307 %; protein sebesar 16,827 %; lemak sebesar 7,533 %; serat kasar sebesar 39,99 % dan karbohidrat sebesar 70,66 % sedangkan biji kacang koro glinding mengandung air sebesar 11,699 %; abu sebesar 3,400 %; protein sebesar 16,995 %; lemak sebesar 4,110; serat kasar sebesar 6,810 % dan karbohidrat sebesar 56,981 %.
2. Rata-rata rendemen ekstrak kacang koro benguk rase dari tepung kacang koro sebesar 10,34 % dan 11,76 % untuk kacang koro glinding
3. Rata-rata rendemen fraksi n-hexan sebesar 22,71 %, fraksi etil asetat sebesar 0,37 % , fraksi butanol sebesar 2,67 %, fraksi air sebesar 3,26 % dari ekstrak biji kacang koro benguk rase sedang untuk kacang kori glinding fraksi n-hexan sebesar 29,73 %, fraksi etil asetat sebesar 0,173 % , fraksi butanol sebesar 4,86 %, fraksi air sebesar 8,12 %
4. Semakin besar konsentrasi fraksi semakin besar aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD), aktivitas katalase (CAT), pemerangkapan radikal *OH dan nilai SAT
5. Jenis antioksidan yaitu α -tokoferol, α -glukosidase, BHT, BHA, ekstrak, fraksi n-hexan, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan fraksi air biji kacang koro benguk rase dan kacang koro glinding berpengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH, pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD), aktivitas katalase (CAT) pemerangkapan radikal *OH dan nilai SAT
6. Aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi koro benguk rase lebih tinggi dibanding ekstrak, fraksi koro glinding
7. Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH ekstrak biji kacang koro konsentrasi 500 $\mu\text{g/mL}$ sebesar 65,11 % lebih besar dibanding α -tokoferol, β -karoten, ekstrak koro glinding tetapi lebih rendah dibanding BHT dan BHA

8. Aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD) ekstrak biji kacang koro benguk rase konsentrasi 500 µg/mL sebesar 382,7 Unit/mL lebih besar dibanding α-tokoferol, karoten, BHA tetapi lebih rendah dibanding BHT
9. Aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH tertinggi adalah fraksi etil asetat koro benguk rase konsentrasi 500 µg/mL sebesar 93,23 % tidak berbeda nyata dengan BHT dan BHA. fraksi air sebesar 68,61 % lebih besar dibanding α-tokoferol, β-karoten, fraksi butanol dan fraksi n-hexan.
10. Aktivitas pemerangkapan radikal bebas anion superoksida (nilai SOD) tertinggi adalah fraksi butanol koro benguk rase konsentrasi 500 µg/mL sebesar 1278,2 Unit/mL lebih besar dibanding fraksi etil asetat, fraksi air, BHT, β-karoten, fraksi n-hexan dan α-tokoferol
11. Aktivitas CAT tertinggi adalah fraksi etil asetat konsentrasi 500 µg/mL sebesar 66,39 % tidak berbeda nyata dengan fraksi butanol sebesar 65,94 % lebih besar dibanding BHT, BHA, α-tokoferol, β-karoten, fraksi air dan fraksi n-hexan
12. Nilai SAT tertingi adalah fraksi butanol biji kacang koro benguk rase konsentrasi 500 µg/mL sebesar 6,09 mmol/mL lebih besar dibanding BHA, BHT, α-tokoferol, β-karoten serta fraksi lain biji kacang koro benguk rase
13. Golongan senyawa flavonoid dalam jumlah banyak (+++) dan golongan fenol dalam jumlah sedang (++) terdapat pada ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan golongan flavonoid, fenol dalam jumlah sedikit (+) pada fraksi n-hexan, fraksi air biji kacang koro benguk rase
14. Golongan senyawa flavonoid dalam jumlah sedang (++) dan golongan fenol dalam jumlah kecil (+) terdapat pada ekstrak, fraksi etil asetat, fraksi butanol dan golongan flavonoid, fenol dalam jumlah sedikit (+) pada fraksi n-hexan, fraksi air, fraksi etil asetat, fraksi butanol biji kacang koro glinding
15. Fraksi aktif antioksidan berdasarkan aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH, nilai SOD, aktivitas CAT, nilai SAT dan pemerangkapan radikal *OH adalah fraksi etil asetat dan fraksi butanol biji kacang koro benguk rase
16. Fraksi aktif antidiabetes adalah fraksi hexan biji kacang koro benguk rase

Daftar pustaka

- Agrawal, P., V. Rai, & R. B. Singh. 1996. *Int. Journal Pharmacol. Ther.* 34, 406-409.
- Allameh, A., M.R. Abyaneh, M. Shams. M.B. Rezaee. K. Jaimand. 2002. Effects of neem leaf extract on production of aflatoxins and activities of fatty acid synthetas, isocitrate dehydrogenase and glutathione S-transferase in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*, 2002,154,2, Proquest Medical Library.
- Anonimus. 2000. Status Antioksidan Pada Penderita Diabetes Melitus. Informasi Laboratorium. Laboratorium Klinik Prodia. Bandung.
- Anonimus. 2000. Peran Kolesterol-HDL dalam menurunkan risiko Kardiovaskuler. Informasi Laboratorium. Laboratorium Klinik Prodia. ISSN 0854-7165
- Anonimus. 2002. A New Perspective on an Old Paradigm.
- Anonimus. 2005 a. Mewaspadaai Komplikasi Diabetes. <http://www.dyvia.com>
- Anonimus. 2005b. Mengenal Diabetes Mellitus. RS PKU Muhammadiyah Yogyakarta.
<http://www.suara-muhammadiyah.or.id/new/content/view/124/27/>
- Anonimus. 2005c. *Mucuna pruriens* (Kawach).
http://www.kedia.com/herbal/kawach_specifi.html
- Anonimus. 2007. Tanaman Obat *Phaseolus lunatus* L.
<http://www.nature.com/hdy/journal/v94>
- Boon, E.M., A. Downs, D. Marcey. 2001. Catalase.
http://www.callutheran.edu/Academic_Programs/Departments/BioDev/mm/catalase/frames/catx.htm. 8 Agustus 2007.
- Bors, W. C. Michel, K. Stettmaier. 2001. Flavonoids and Other Polyphenols. Packer, L.Ed. Academic Press. San Diego.
- Bray, T.M., J. Wang, M.D. Noseworthy, J.P. Philips. 2000. Zinc Protection Against Free Radicals in the Pathogenesis of Diabetes. Departments of Nutritional Sciences and Molecular Biology. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. AOCS Press. Champaign, Illionis.
- Chakravarti, R N., D. Chakravarti, M.I, Itty. *Bull. Calcutta Sch. Trop.Med.*, 1996,14, 126
- Columbia University.. The Columbia Electronic Encyclopedia Copyright © 2003, Columbia University Press.Licensed from Columbia University Press. All rights reservedalkaloid, Organic Chemistry
<http://reference.allrefer.com/encyclopedia/A/alkaloid.html>
- Constantino, L., A. Albasini, G. Rastelli, S. Benvenuti. 1992. Activity of Polyphenolic Crude Extract as Scavenger of Superoxide Radicals and Inhibitors of Xanthine Oxidase. *Planta medica*, 58, 342-344.
- Friedli, G.L. 2000. Flavonoid.
<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/flavonoids.html>
- Ganong, W.F., 1993. Review of Medical Physiology. Lange Medical Publication. Sanfransisco California.
- Gomes, A.J., C.N. Lunardi, S. Gonzales, A.C. Tedesco. 2001. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. *Braz J Med Biol Res*, November 2001, Volume 34(11) 1487-1494

- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press. New York.
- Heikkila, R.E., G.W. Winston, G. Cohen. 1976. Bioche, Pharmacol. 25. 1085-1092
- Hughes, K. An Antioxidant for Diabetes. 2003. <http://www.bnpmmedia.com/>
- Hall, C.A., Cuppett, S.L 1997. Structure-Activities of Natural Antioxidants. In : Antioxidant Methodology In Vivo and In Vitro Concepts. (Aruoma, O.I and Cuppett, S.L. eds.), AOCS press, Champaign, Illinois, pp. 141-172.
- Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Institut Teknologi bandung. Bandung.
- Hollman, P. C. H., M. G. L. Hertog, dan M. B. Katan. 1996. Analysis and Health Effects of Flavonoids. Food Chemistry 57(1):43-46.
- Hudson, B. J. F. 1999. Food Antioxidants. Elsevier Applied Modern Toxicology. Mc. Graw-Hill. Singapore.
- Hosetmann, K., A. Hosetmann, M. Marston. 1995. Cara Kromatografi Preparatif. Penerbit ITB Bandung.
- Kirste, B. 1994. Terpenes. Institute of Chemistry Department of Biology, Cemistry, Pharmacy.FU Berlin. http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/oc/terpene/terpene_en.html
- Kariadi, S.H. K.S. 2001. Peranan Radikal Bebas dan Antioksidan Pada Penyakit Degeneratif Khususnya Diabetes Mellitus. Bagian Penyakit dalam. Fakultas Kedokteran/RS Hasan Sadikin. Bandung.
- Katzung, B.M. 2002. Farmakologi Dasar dan Klinik. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Salemba Medika. Jakarta.
- Kimbrough, D.R., M.A. Magoun, M. Langfur. 1997. A Laboratory Experiment Investigating Different Aspects of Catalase Activity in an Inquiry - Based Approach. Journal of Chemical Education, February 1997 Vol. 74 No. 2 p. 210.
- Kobayashi, K.Y. Saito, I. Nakazawa, F. Yashizaki. 2000. Biol. Pharm. Bull. 2000. 23, 1250-125
- Lee, D.M. 2002. Issue 122 Item 9 Antioxidant Vitamins Helpful in Diabetic Ketoacidosis Treatment. <http://www.diabetesincontrol.com/aserver/adclick.php?n=a97aadea>
- Mullen, R.T., D.J. Gifford. 1993. Purification and Characterization of Catalase from Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) Megagametophytes. Plant Physiol. (1993). 103 : 477-483.
- Malhotra, S., A.P. Singh. 2005. Monoterpene Alkaloid Isolated From *Mucuna pruriens*. Medical Executive. Ind-Swift Ltd.
- PPI. Free Lists. 2005. Jumlah Penderita di Indonesia Keempat Dunia. <http://www.ppi-india.org/> 4 September 2005. Down load 20 Agustus 2007.
- Pakta Foundation.2005 PAKTA Foundation and Jakarta Anti Drug Forum. <http://www1.rad.net.id/aids/Naza/steroid.html>
- Papas, A.M. Antioxidant Status, Diet, Nutrition and Health. CRC Press. Washington, D.C, 1999.
- Pieta, P.G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. J. Nat. Prod. 63, 1043-1046.
- Pieta, P., P. Simonetti, P. Mauri. 1998. Antioxidant activity of selected medicinal plants. J. Agric Food Chem 1998; 46: 307-315.
- Pokorny, J., N.Yanishlieva, M. Gordon. 2001. Antioxidants in Food. CRC Press.Washington,DC.

- Que, F., L. Mao, X. Zheng. 2007. In vitro and in vivo antioxidant activities of daily flowers and the involvement of phenolic compounds. *Asia Pac. J Clin Nutr* 2007; 16 (Suppl 1): 196-203
- Rajeshwar, Y., G.P.S. Kumar, M. Gupta, U.K. Mazumber. 2005. Studie on In Vitro Antioxidant Activities of Methanol Extract of *Mucuna pruriens* (Fabaceae) Seeds. *European Bulletin of Drug Research*. Vol 13, No 1, 2005.
- Robinson, T. 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Penerbit ITB. Bandung.
- Radox Laboratories Ltd. 1994. Total Antioxidant Status. Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom. BT294 QY
- Radox Laboratories Ltd. 2004. Superoxide Dismutase (SOD). Ardmore, Diamond Road, Crumlin, Co. Antrim, United Kingdom, BT29 4QY.
- Safitri, R., M. Ani, R. Rumampuk. 2001. Uji Aktivitas Peredaman (Scavenging) dari Bahan Alam Terhadap Radikal Bebas dan Peranan Antioksidan dalam Meningkatkan Kesehatan Menuju Indonesia Sehat 2010. Pusat Penelitian Kesehatan, Lembaga Penelitian Universitas Pajajaran, Bandung.
- Safitri, R. 2002. Karakterisasi Sifat Antioksidan In Vitro Beberapa Senyawa Yang Terkandung Dalam Tumbuhan Secang (*Caesalpinia sappan* L.). Disertasi. Program Pasca Sarjana Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Schoenhals, K. 2005. Prepared Foods. Virgo Publishing. Health & Nutrition Division. <http://www.vpico.com>
- Serafani, M., J.A.N. Laranjinha, L.M. Almeida, G. Maiani. Inhibition of human LDL lipid peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *J.Nutr. Biochem*. 2000;11:585-590.
- Siddhuraju, P., K. Vijayakumari, K. Janardhanan. 1996. Chemical Composition and Protein of The Little-Known Legume Velvet Bean (*Mucuna pruriens* (L) DC.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44 (9) 2636-2641.
- Siddhuraju, P., K. Becker. 2001. Effect of various processing methods on antinutrients in vitro protein and starch digestibility of two indigenous varieties of Indian tribal pulse, *Mucuna pruriens* var *utilis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49 (6) 3058-3067.
- Steel, R.A., J.H. Torrie. 1993. Prinsip Dan Prosedur Statistika suatu pendekatan biometric. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Suryadhana, A. 2000. Pengaruh Ekstrak Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Ness) Secara Oral Terhadap Uji Toleransi Glukosa Darah Pada Tikus Putih. Kongres Nasional Obat Tradisional Indonesia (KONAS OTI), Prosiding Abstrak Sidang Pleno & Simposium Ilmiah, Surabaya.
- Suryowinoto. S. 2005. Mengenal Beberapa Tanaman Yang Digunakan Masyarakat Sebagai Antidiabetik Untuk Menurunkan Kadar Gula Dalam Darah. Badan Pengawas Obat dan Makanan. <http://www.pom.go.id/default.asp>
- Sumastuti, R., M. Sonlimar. 2002. Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkotadewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.] Terhadap Sel HeLa. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjahmada. Yogyakarta.
- Steelsmith, L. 2001. Antioxidant nutrients help offset diabetes. <http://www.gannett.com/>
- Tjitrosoepomo, G. 1996. Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta). Yogyakarta.

- Sumastuti, R., M. Sonlimar. 2002. Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkotadewa [*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.] Terhadap Sel Hela. Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjahmada. Yogyakarta.
- Steelsmith, L. 2001. Antioxidant nutrients help offset diabetes. <http://www.gannett.com/>
- Tjitrosoepomo, G. 1996. Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta). Yogyakarta.
- Tiwari, A.K., J.M. Rao. 2002. Diabetes mellitus and multiple therapeutic approaches of phytochemicals : Present status and future prospect. *Current Science*, vol 83, no1 (30-38).
- Udedibie, A.B.I., C.R. Cartini, C.R. 1998. Brazilian *Mucuna pruriens* seeds (velvet bean) lack hemaagglutinating activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46 (4) 1450-1452
- Unlu, G.V., F. Candan, A. Sokmen, D. Dafarera, M. Polssiou, M. Sokmen, E. Domez, B. Tepe. 2003. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 63-67.
- Vitaminstuff. 2007. Catalase. <http://www.vitaminstuff.com/qa/antioxidant-catalase-qa-index.html> 8 Agustus 2007.
- Udedibie, A.B.I., C.R. Cartini, C.R. 1998. Brazilian *Mucuna pruriens* seeds (velvet bean) lack hemaagglutinating activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46 (4) 1450-1452
- Vaziri, N. Synthetic antioxidant to combat diabetes <http://www.lifeextensionvitamins.com/nsearch.html>
- Vav Life Science. 2005. *Mucuna pruriens*. http://www.kedia.com/herbal/kawach_specifi.html
- Wikipedia. 2005. Alkaloid. <http://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid>
- Wikipedia. 2005. Terpene. <http://en.wikipedia.org/wiki/Triterpene>

Lain-lain

Sebagian dari hasil penelitian ini sudah diseminasikan pada seminar nasional yaitu :

1. Seminar Nasional Klaster Riset yang diselenggarakan oleh Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta pada tanggal 30 Oktober 2007 dengan judul "Aktivitas Antioksidan Pemerangkapan Radikal Anion Superoksida Ekstrak dan Fraksi Kacang Koro (*Mucuna pruriens* L). Prosiding ISBN : 978-97915614-7-1
2. Seminar Nasional Sain dan Teknologi yang diselenggarakan oleh Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta pada tanggal 7 Nopember 2007 dengan judul "Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Kacang Koro Benguk Rase (*Mucuna pruriens* L). Prosiding ISBN : 978-979-16967-0-8

LAMPIRAN

Lampiran 1 . Data, sidik ragam dan uji jarak berganda Duncan (UJBD) hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (%) pada ekstrak kacang koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan		Jenis antioksidan					
Konsentrasi	Ulangan	Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	Eks benguk	Eks glinding
125 µg/mL	I	41.4037	5.5040	47.7950	57.7811	50.0317	35.0781
	II	39.2369	6.9920	47.3540	59.8642	49.6990	40.2453
	III	41.8276	6.9280	48.0079	59.2604	49.8257	45.5631
250 µg/mL	I	52.7555	14.0640	80.2768	90.5509	55.8143	50.3415
	II	50.3533	15.3440	80.5809	90.2189	57.0817	46.3412
	III	49.7409	13.6480	81.1740	90.8226	57.0342	48.2567
500 µg/mL	I	56.0528	21.584	91.6058	95.4415	63.3397	50.1389
	II	55.7230	18.816	91.2561	94.5811	66.1914	60.2561
	III	53.3679	20.144	91.8644	94.7170	65.8112	60.1252

Tabel Sidik ragam pemerangkapan radikal bebas DPPH pada ekstrak kacang koro benguk Rase dan koro glinding

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	5	25.387,0707	5.077,4141	1.142,4168	3,57439
Konsentrasi (B)	2	5.121,0749	2.560,5374	576,1202	5,24789
Interaksi (AxB)	10	1.681,8575	168,1857	37,84175	2,85895
Galat	36	160,0002	4,4444		
Total	53	32.350,0032			

Rataan dan UJBD aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH (%) pada ekstrak koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Konsentrasi (µg/mL)		
	125	250	500
Tokoferol	40,8227 a B	50,9499 b C	55,0479 c B
Karoten	6,4747 a A	14,352 b A	20,1813 c A
BHT	47,7190 a C	80,6772 b E	91,5754 c D
BHA	58,9686 a D	90,5308 b F	94,9132 c D
Ekstrak koro benguk rase	49,8521 a C	56,6434 b D	65,1141 c C
Ekstrak koro glinding	40,2955 a B	48,3131 ab B	56,8401 b B

Lampiran 2 . Data, sidik ragam, UJBD hasil uji aktivitas antioksidan SOD (unit/mL) pada ekstrak koro benguk rase, koro glinding

Perlakuan		Jenis antioksidan					
Konsentrasi	Ulangan	Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	Eks benguk	Eks glinding
125 µg/mL	I	44.4	44.7	125.4	125.1	174.9	30.45
	II	45.3	37.8	119.4	122.7	171.3	37.45
	III	41.7	41.1	120.9	127.8	180.3	35.12
250 µg/mL	I	57	68.1	206.4	202.5	263.1	54.23
	II	54.9	78.6	205.2	207	259.8	47.12
	III	53.7	74.7	208.8	200.7	271.8	49.34
500 µg/mL	I	81.6	110.7	427.5	238.2	381.6	42.56
	II	78.3	115.5	465.9	247.5	375.6	56.67
	III	80.7	113.7	446.7	245.1	390.6	57.45

Tabel Sidik ragam uji aktivitas SOD pada ekstrak kacang koro benguk rase dan koro glinding

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	5	480.489,9	96.097,97	2.509,108	3,57439
Konsentrasi (B)	2	152.733,5	76.366,76	1.993,928	5,24789
Interaksi (AxB)	10	114.485,2	11.448,52	298,9196	2,85895
Galat	36	1.378,788	38,2997		
Total	53	749.087			

Rataan dan UJBD aktivitas SOD (unit/mL) pada ekstrak kacang koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Konsentrasi (µg/mL)		
	125	250	500
Tokoferol	43,80 a B	55,2 b A	80,20 c B
Karoten	41,20 a B	73,80 b B	113,30 c C
BHT	121,90 a C	206,8 b C	446,70 c F
BHA	125,20 a C	203,4 b C	243,60 c D
Ekstrak koro benguk rase	175,50 a D	264,9 b D	382,60 c E
Ekstrak koro glinding	34,34 a A	50,23 b A	52,23 b A

Lampiran 3. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji aktivitas antioksidan SAT (mmol/L) pada fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Ulangan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
		125	250	500
Tokoferol	1	0.41	0.67	1.66
	2	0.43	0.70	1.70
	3	0.45	0.73	1.81
Karoten	1	0.02	0.12	0.21
	2	0.03	0.15	0.24
	3	0.03	0.14	0.25
BHT	1	0.80	1.29	3.99
	2	0.84	1.27	4.05
	3	0.87	1.3	3.84
BHA	1	1.02	2.23	5.93
	2	1.08	2.29	5.89
	3	1.09	2.35	5.81
F. hexan benguk rase	1	0.12	0.22	0.67
	2	0.14	0.27	0.71
	3	0.10	0.19	0.64
F. etil benguk rase	1	0.68	1.32	2.27
	2	0.75	1.35	2.31
	3	0.62	1.28	2.26
F. butanol benguk rase	1	1.51	3.02	6.04
	2	1.47	3.08	6.12
	3	1.56	3.1	6.11
F. air benguk rase	1	0.32	0.73	1.41
	2	0.35	0.78	1.52
	3	0.39	0.77	1.38
F. hexan koro glinding	1	0.09	0.13	0.19
	2	0.08	0.15	0.21
	3	0.06	0.14	0.18
F. etil koro glinding	1	0.12	0.17	0.24
	2	0.10	0.19	0.27
	3	0.15	0.14	0.23
F. butanol koro glinding	1	0.24	0.65	1.57
	2	0.27	0.69	1.59
	3	0.29	0.68	1.61
F. air koro glinding	1	0.10	0.17	0.28
	2	0.08	0.19	0.31
	3	0.11	0.14	0.26

Tabel Sidik ragam aktivitas antioksidan SAT pada fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	11	136,5516	12,4138	7.749,6433**	2,50447
Konsentrasi (B)	2	47,9911	23,9956	14.979,8884**	4,9126
Interaksi (AxB)	22	51,0532	2,3206	1.448,6979**	2,09778
Galat	72	0,1153	0,0016		
Total	107	235,7112			

Rataan dan UJBD aktivitas SAT (mmol/L) pada fraksi koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	0,4300 a E	0,7000 b C	1,7233 c E
Karoten	0,0267 a A	0,1367 b A	0,2333 c A
BHT	0,8367 a G	1,2867 b E	3,9600 c G
BHA	1,0633 a H	2,2900 b F	5,8767 c H
F.hexan benguk rase	0,1200 a B	0,2267 b B	0,6733 c B
F.etil benguk rase	0,6833 a F	1,3167 b E	2,2800 c F
F. butanol benguk rase	1,5133 a I	3,0667 b G	6,0900 c I
F. air benguk rase	0,3533 a D	0,7600 b D	1,4367 c C
F. hexan koro glinding	0,0767 a AB	0,1400 b A	0,1933 c A
F.etil koro glinding	0,1233 a B	0,1667 b A	0,2467 c A
F.butanol koro glinding	0,2667 a C	0,6733 C	0,15900 c D
F. air koro glinding	0,0967 a B	0,1667 b A	0,2833 c A

Lampiran 4. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji antioksidan nilai SOD (Unit/mL) pada fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Ulangan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
		125	250	500
Tokoferol	1	44.4	57	81.6
	2	45.3	54.9	78.3
	3	41.7	53.7	80.7
Askorbat	1	44.7	68.1	110.7
	2	37.8	78.6	115.5
	3	41.1	74.7	113.7
BHT	1	125.4	206.4	427.5
	2	119.4	205.2	465.9
	3	120.9	208.8	446.7
BHA	1	125.1	202.5	238.2
	2	122.7	207	247.5
	3	127.8	200.7	245.1
F. hexan benguk rase	1	37.5	70.8	168.9
	2	37.5	69.3	159.3
	3	41.1	71.7	164.1
F. etil benguk rase	1	220.5	394.5	553.2
	2	224.7	408.9	563.1
	3	226.8	404.1	540.3
F. butanol benguk rase	1	172.2	364.8	1190.7
	2	172.5	399	1374.6
	3	170.7	388.5	1269.3
F. air benguk rase	1	155.4	295.8	520.5
	2	153	312	482.4
	3	154.2	299.1	508.5
F. hexan koro glinding	1	26.67	35.45	40.12
	2	29.34	32.67	46.34
	3	30.12	37.12	49.91
F. etil koro glinding	1	40.342	50.12	60.12
	2	37.67	55.56	62.12
	3	39.34	50.23	63.45
F. butanol koro glinding	1	45.53	57.34	74.27
	2	40.46	50.12	79.12
	3	45.87	53.67	80.12
F. air koro glinding	1	35.12	45.67	60.45
	2	35.56	50.98	63.56
	3	39.23	55.78	65.23

Tabel Sidik ragam nilai SOD pada fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	11	3.233.018	293.910,7	1.048,343**	2,50447
Konsentrasi (B)	2	855.131,5	427,565,8	1.525,075**	4,9126
Interaksi (AxB)	22	1.791.698	81.440,81	290,4894**	2,09778
Galat	72	20.185,72	280,3573		
Total	107				

Rataan dan UJBD nilai SOD (unit/mL) pada fraksi koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	43,80 a D	55,0 b B	80,20 c AB
Karoten	41,20 a CD	73,80 b C	113,30 c B
BHT	121,90 a E	206,80 b D	446,70 c E
BHA	125,20 a E	203,40 b D	243,60 c D
F.hexan benguk rase	38,70 a BC	70,60 b C	164,10 c C
F.etil benguk rase	224,00 a H	402,50 b G	552,20 c G
F. butanol benguk rase	171,80 a G	384,10 b F	1278,20 b H
F. air benguk rase	154,20 a F	302,30 b E	503,8 c F
F. hexan koro glinding	28,70 a A	35,08 a A	45,46 b A
F.etil koro glinding	39,12 a B	51,97 b B	61,90 c AB
F.butanol koro glinding	43,95 a D	53,71 b B	77,84 c AB
F. air koro glinding	36,64 a B	50,81 b B	63,08 c AB

Lampiran 5. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji aktivitas antioksidan SOD (Unit/mL) pada fraksi kacang koro benguk rase

Konsentrasi	Perlakuan	Jenis antioksidan							
		Ulangan	Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	F.hexan	F. etil	F.butanol
125 µg/mL	I	44.4	44.7	125.4	125.1	37.5	220.5	172.2	155.4
	II	45.3	37.8	119.4	122.7	37.5	224.7	172.5	153
	III	41.7	41.1	120.9	127.8	41.1	226.8	170.7	154.2
250 µg/mL	I	57	68.1	206.4	202.5	70.8	394.5	364.8	295.8
	II	54.9	78.6	205.2	207	69.3	408.9	399	312
	III	53.7	74.7	208.8	200.7	71.7	404.1	388.5	299.1
500 µg/mL	I	81.6	110.7	427.5	238.2	168.9	553.2	1190.7	520.5
	II	78.3	115.5	465.9	247.5	159.3	563.1	1374.6	482.4
	III	80.7	113.7	446.7	245.1	164.1	540.3	1269.3	508.5

Tabel Sidik ragam uji aktivitas SOD pada fraksi kacang koro

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	7	2.260.671,36	322.953,0514	776,8640**	3,03719
Konsentrasi (B)	2	1.187.120,208	593.560.1038	1.427,8097**	5,0767
Interaksi (AxB)	14	1.455.621,713	103.972,9795	250,10715**	2,4778
Galat	48	19.954,26	415,7138		
Total	71	4.923.367,54			

Rataan dan UJBD aktivitas SOD (unit/mL) pada fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	43,8 a B	55,2 b A	80,2 c A
Karoten	41,2 a B	73,8 b B	113,3 c AB
BHT	121,9 a C	206,8 b C	446,7 c D
BHA	125,2 a C	203,4 b C	243,6 c C
Fraksi hexan	38,7 a AB	70,6 b B	164,1 c B
Fraksi etil asetat	224 a F	402,5 b F	552,2 c E
Fraksi butanol	171,8 a E	384,1 b E	1278,2 c F
Fraksi air	154,2 a D	302,3 b D	503,8 c DE

Lampiran 6 . Data, sidik ragam, UJBD hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal bebas DPPH (%) pada fraksi kacang kor benguk rase

Konsentrasi	Perlakuan	Jenis antioksidan							
		Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	F.hexan	F. etil	F.butanol	F.air
125 µg/mL	I	41.4037	5.5040	47.7950	57.7811	7.6227	47.5175	31.1770	34.2728
	II	39.2369	6.9920	47.3540	59.8642	6.9947	47.7074	31.3522	32.8563
	III	41.8276	6.9280	48.0079	59.2604	7.4328	49.4013	30.6221	33.4550
250 µg/mL	I	52.7555	14.0640	80.2768	90.5509	24.4889	74.6203	40.0555	44.7430
	II	50.3533	15.3440	80.5809	90.2189	24.0070	74.7810	43.0345	44.7722
	III	49.7409	13.6480	81.1740	90.8226	24.5765	75.4819	42.4065	45.1519
500 µg/mL	I	56.0528	21.584	91.6058	95.4415	30.8265	93.0053	60.3388	68.9106
	II	55.7230	18.816	91.2561	94.5811	32.1554	93.8814	58.3382	67.7570
	III	53.3679	20.144	91.8644	94.7170	33.4404	92.8154	59.8715	69.1735

Tabel Sidik ragam uji aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0,01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	7	37.831,6403	5.404,52	6.410,764**	3,03719
Konsentrasi (B)	2	11.093,5425	5.546,771	6.579,501**	5,0767
Interaksi (AxB)	14	2.151,3580	153,6684	182,2793**	2,4778
Galat	48	40,4658	0,8430		
Total	71	51.117,0066			

Rataan dan UJBD aktivitas pemerangkapan radikal bebas DPPH pada fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	40,8227 a E	50,9499 b E	55,0479 c C
Karoten	6,4747 a A	14,352 b A	20,1813 c A
BHT	47,7190 a E	80,6772 b G	91,5754 c F
BHA	58,9686 a F	90,5308 b H	94,9132 c G
Fraksi hexan	7,3501 a A	24,3575 b B	32,1408 c B
Fraksi etil asetat	48,2087 a E	74,9611 b F	93,2340 c FG
Fraksi butanol	31,0504 a B	41,8322 b C	59,5162 c D
Fraksi air	33,5280 a C	44,8890 b D	68,6137 c E

Lampiran 7. Data, sidik ragam dan uji jarak berganda Duncan (UJBD) hasil uji aktivitas katalase (CAT) pada fraksi kacang koro benguk rase (%)

Perlakuan		Jenis antioksidan							
Konsentrasi	Ulangan	Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	F.hexan	F. etil	F.butanol	F.air
125 g/mL	I	23.8927	14.6731	22.1452	46.1585	10.4248	39.4095	38.2284	23.8024
	II	24.8268	16.4507	26.1525	49.2317	8.5267	44.1398	42.3019	26.5140
	III	19.2829	14.9744	23.0792	52.6966	7.6529	41.0967	45.1943	23.3805
250 g/mL	I	52.2447	22.8683	49.7740	49.9548	15.5167	60.4399	51.9132	22.5972
	II	50.0151	25.7909	47.0925	46.9117	14.6430	62.3983	54.9864	24.2543
	III	55.5890	20.6689	54.2332	55.5890	15.5167	54.8659	58.0597	27.6288
500 g/mL	I	55.2275	23.5312	62.5188	60.9521	19.7650	67.0985	62.9105	28.1711
	II	50.5574	21.8138	59.4155	64.0253	20.1265	69.4788	68.1832	31.0636
	III	54.7755	24.3447	56.5532	56.6737	18.3790	62.5791	66.7370	29.7077

Tabel Sidik ragam uji aktivitas katalase (CAT) pada fraksi kacang koro

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	7	16.845,1142	2.406,4449	321,5587**	3,03719
Konsentrasi (B)	2	4.422.0152	2.211,0076	295,4436**	5,0767
Interaksi (AxB)	14	1.903,8924	135,9923	18,1718**	2,4778
Galat	48	359,2170	7,4839		
Total	71	23.530,2388			

Rataan dan UJBD aktivitas katalase (%) pada fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	22.6675 a C	52.6162 b C	53.5201 b C
Karoten	15.3661 a B	23.1094 b B	23.2299 b A
BHT	23.7923 a C	50.3666 b C	59.4958 c D
BHA	49.3623 a E	50.8185 a C	60.5504 b D
Fraksi hexan	8.8681 a A	15.2255 b A	19.4235 c A
Fraksi etil asetat	41.5487 a D	59.2347 b E	66.3855 c E
Fraksi butanol	41.9082 a D	54.9864 b CD	65.9436 c E
Fraksi air	24.5656 a C	24.8268 a B	29.6475 b B

Lampiran 8. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji aktivitas antioksidan pemerangkapan radikal *OH pada fraksi kacang koro benguk rase (%)

Perlakuan		Jenis antioksidan							
Konsentrasi	Ulangan	Tokoferol	Askorbat	BHT	BHA	F.hexan	F. etil	F.butanol	F.air
125 µg/mL	I	61.8701	30.2312	75.7856	77.7789	27.7891	67.7812	75.4561	50.3451
	II	65.3409	35.5613	77.6889	75.8975	29.3567	65.7891	74.2346	49.5671
	III	66.3478	32.7634	79.7865	70.1034	33.5671	63.1267	77.7812	56.3451
250 µg/mL	I	75.7877	43.2345	85.6523	80.1256	48.2541	78.7791	80.1256	65.1245
	II	76.8991	45.1223	87.3412	79.5671	49.3461	80.8912	85.6791	63.4561
	III	75.3456	40.9112	89.1212	79.8765	45.2341	83.4561	88.7812	60.3451
500 µg/mL	I	79.5667	56.7812	95.3423	90.1245	50.2761	85.7812	98.6751	60.1345
	II	77.5661	51.7834	96.4534	91.6781	50.3451	87.6541	99.7651	65.1289
	III	80.6512	50.5667	97.2312	91.5682	55.4510	83.7615	95.7812	66.4510

Tabel Sidik ragam uji aktivitas antioksidan OH pada fraksi koro benguk rase

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	7	20.760.22	2.965,746	473,8213	3,03719
Konsentrasi (B)	2	4.067,656	2.033,828	324,9338	5,0767
Interaksi (AxB)	14	324,9033	23,2074	3,7077	2,4778
Galat	48	300,442	6,2592		
Total	71				

Rataan dan UJBD aktivitas pemerangkapan OH (%) pada fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	64,5196 a C	76,0108 b D	79,2613 c C
Karoten	32,8520 a A	43,0893 b A	53,0438 c A
BHT	77,7537 a D	87,3716 b G	96,3423 c F
BHA	74,5933 a D	79,8564 b DE	91,1236 c E
Fraksi hexan	30,2376 a A	47,6114 b B	52,0247 b A
Fraksi etil asetat	65,5657 a C	81,0421 b EF	85,7322 c D
Fraksi butanol	75,8240 a D	84,8620 b FG	98,0738 c F
Fraksi air	52,0858 a B	62,9752 b C	63,9048 c B

Lampiran 9. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji aktivitas antioksidan SAT (mmol/L) fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan		Jenis antioksidan							
Konsentrasi	Ulangan	Tokoferol	Karoten	BHT	BHA	F.hexan	F. etil	F.butanol	F.air
125 µg/mL	I	0.41	0.02	0.80	1.02	0.12	0.68	1.51	0.32
	II	0.43	0.03	0.84	1.08	0.14	0.75	1.47	0.35
	III	0.45	0.03	0.87	1.09	0.10	0.62	1.56	0.39
250 µg/mL	I	0.67	0.12	1.29	2.23	0.22	1.32	3.02	0.73
	II	0.70	0.15	1.27	2.29	0.27	1.35	3.08	0.78
	III	0.73	0.14	1.3	2.35	0.19	1.28	3.1	0.77
500 µg/mL	I	1.66	0.21	3.99	5.93	0.67	2.27	6.04	1.41
	II	1.70	0.24	4.05	5.89	0.71	2.31	6.12	1.52
	III	1.81	0.25	3.84	5.81	0.64	2.26	6.11	1.38

Tabel Sidik ragam uji aktivitas antioksidan SAT pada fraksi koro benguk rase

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antioksidan (A)	7	98,3122	14,0446	6428,552**	3,03719
Konsentrasi (B)	2	59,5092	29,7546	13.619,39**	5,0767
Interaksi (AxB)	14	36,6809	2,6201	1.119,268**	2,4778
Galat	48	0,1049	0,0022		
Total	71	194,6072			

Rataan dan UJBD aktivitas status antioksidan total (SAT) (%) pada fraksi kacang koro benguk rase

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Tokoferol	0,4300 a D	0,7000 b C	1,7233 c D
Karoten	0,0267 a A	0,1367 b A	0,2333 c A
BHT	0,8367 a F	1,2867 b D	3,9600 c F
BHA	1,0633 a G	2,2900 b E	5,8767 c G
Fraksi hexan	0,1200 a B	0,2267 b B	0,6733 c B
Fraksi etil asetat	0,6833 a E	1,3167 b D	2,2800 c E
Fraksi butanol	1,5133 a H	3,0667 b F	6,0900 c H
Fraksi air	0,3533 a C	0,7600 b C	1,4367 c C

Lampiran 10. Data, sidik ragam dan UJBD hasil uji aktivitas penghambatan α -glukosidase (%) fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Ulangan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
		125	250	500
Glucobasy	1	13.2234	31.3925	51.1049
	2	13.4339	32.7955	51.4556
	3	11.1189	30.1999	46.5451
Eks. Koro benguk rase	1	30.9865	40.3445	60.4561
	2	28.7651	38.4512	58.3412
	3	25.3561	39.7659	56.5671
F.hexan benguk rase	1	48.3451	50.6742	65.7801
	2	50.4561	53.8912	68.4512
	3	49.7665	50.3178	69.5412
F. etil benguk rase	1	40.4513	53.9865	58.5413
	2	38.4513	45.6721	60.5413
	3	34.6751	40.3412	60.3121
F. butanol benguk rase	1	15.4513	18.6713	25.7652
	2	14.4513	15.6715	20.3451
	3	18.4513	20.5613	27.5613
F. air benguk rase	1	10.5161	17.5614	28.5614
	2	8.6151	16.6715	25.4513
	3	10.6171	14.7161	28.5613
Eks koro glinding	1	24.8281	31.9807	54.3329
	2	26.6162	35.0069	52.1320
	3	23.8652	38.3769	49.3122
F. hexan koro glinding	1	34.2503	47.6616	60.8666
	2	31.4993	50.2751	58.2531
	3	35.0069	48.7620	58.8721
F. etil koro glinding	1	8.0468	16.9876	23.5213
	2	10.7290	14.9243	21.9395
	3	10.1100	12.7235	18.5695
F. butanol koro glinding	1	7.4966	9.8349	12.9298
	2	9.1472	10.0413	13.5488
	3	8.7345	10.1100	12.7923
F. air koro glinding	1	7.3590	14.6492	20.7015
	2	8.1843	13.6176	23.1087
	3	5.1582	15.1994	20.2889

Tabel Sidik ragam aktivitas antidiabetes pada fraksi kacang koro benguk rase dan koro glinding

Sumber Ragam	Derajat Bebas	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F hitung	F tabel 0.01
Perlakuan :					
Jenis antidiabetes (A)	10	23.504,86	2.350,4856	469,0167**	2,6020
Konsentrasi (B)	2	6.486,457	3.243,2286	647,1549**	4,9420
Interaksi (AxB)	20	1.561,628	78,0814	15,5804**	2,1675
Galat	66	330,7602	5,0115		
Total	98	31.883,7			

Rataan dan UJBD aktivitas antidiabetes (%) pada fraksi koro benguk rase dan koro glinding

Perlakuan	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)		
	125	250	500
Glucobasy	12,5921 a B	31,4626 b C	49,7019 c D
Eks koro benguk rase	28,3692 a E	39,5205 b D	58,4548 c E
F.hexan benguk rase	49,5226 a H	51,6277 a F	67,9242 b F
F.etil benguk rase	37,8592 a G	46,6666 b E	59,7982 c E
F. butanol benguk rase	16,1180 a C	18,3014 a B	24,5572 b BC
F. air benguk rase	9,9161 a AB	16,3163 b B	27,5247 c C
Eks koro glinding	25,1032 a D	35,1215 b CD	51,9257 c D
F. hexan koro glinding	33,5855 a F	48,8996 b EF	59,3306 E
F.etil koro glinding	9,6286 a AB	14,8785 b B	21,3434 c B
F.butanol koro glinding	8,4594 A	9,9954 b A	13,0903 c A
F. air koro glinding	6,9001 a A	14,4887 b AB	21,3664 c B

Lampiran 11. Hasil uji fitokimia kacang koro benguk rase (*Mucuna pruriens* L.) dan koro glinding (*Phaseolus lunatus* L.)

Sampel	Golongan senyawa							
	Tanin	Flavo noid	Fenol	Sapo nin	Terpe noid	Triter penoid	Steroid	Alkaloid
Ekstrak benguk rase	+++	+++	++	+	+	-	++	++
Fraksi n-hexan benguk rase	-	+	+	-	+	-	+	-
Fraksi etilasetat benguk rase	++	+++	++	-	-	-	+	+
Fraksi butanol benguk rase	+++	+++	++	+	-	-	+	+
Fraksi air benguk rase	++	+	+	+	-	-	-	++
Ekstrak koro glinding	++	++	+	+	+	-	+	+
Fraksi n-hexan koro glinding	-	+	+	-	+	-	+	-
Fraksi etilasetat koro glinding	+	+	+	+	+	-	+	+
Fraksi butanol koro ginding	++	++	+	+	+	-	+	+
Fraksi air koro glinding	++	+	+	+	-	-	+	+

Ket: +++ = Golongan senyawa yang terkandung banyak

++ = Golongan senyawa yang terkandung sedang

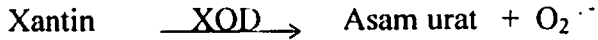
+ = Golongan senyawa yang terkandung sedikit

- = Golongan senyawa yang terkandung tidak terdeteksi

Pengujian superoksida dismutase (SOD) (Constantino *et al.* 1992)

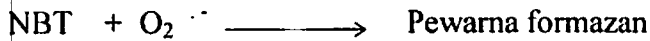
Prinsip dasar pengukuran superoksida dismutase (SOD) :

Reaksi antara xantin dan xantin oksidase yang digunakan menghasilkan $O_2^{\cdot -}$



Radikal superoksida yang dihasilkan akan bereaksi dengan Blue tetrazolium (NBT)

sehingga menghasilkan pewarna formazan biru ungu.



SOD yang terdapat dalam plasma atau serum berlomba dengan NBT untuk bereaksi dengan radikal superoksida sehingga menghambat pembentukan zat warna.



Aktivitas SOD diukur pada 560 nm melalui derajat penghambatan (inhibisi) pembentukan zat warna.

Aktivitas enzim SOD dapat dinilai berdasarkan kemampuannya menghambat reaksi yang dikatalisi oleh radikal superoksida, seperti menghambat reduksi sitokrom C dan nitro blue tetrazolium (NBT).

Tahapan Reaksi penghambatan Reduksi NBT

Xantin Oksidase

1. Xantin ----- Superoksida ($O_2^{\cdot -}$)
Diinkubasi pada $37^{\circ}C$
2. NO_2^- - TB + $O_2^{\cdot -}$ ----- Senyawa Kompleks berwarna biru
Selama 20 menit
3. Sampel yang mengandung SOD ----- Menghambat reduksi NBT, menghambat warna biru

4. Warna yang terbentuk diukur pada spektroskopi visibel, $\lambda = 560 \text{ nm}$

Dalam sistem ini $\text{O}_2^{\bullet -}$ yang dihasilkan di deteksi dengan metoda reduksi nitro blue

tetrazolium