

3 IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN PADA MOLUSKA

Berikut tabulasi data mengenai jenis senyawa antioksidan yang ditemukan pada moluska dengan habitat pada perairan laut, tawar dan darat. Pada tabel 3., ditemukan 26 jurnal penelitian mengenai senyawa antioksidan dan metode pengujian antioksidan pada moluska dengan persebaran penelitian terbanyak pada daerah China dan India. Sedangkan daerah Indonesia, hanya sedikit penelitian yang membahas mengenai senyawa antioksidan pada moluska yang dapat dimanfaatkan dalam kehidupan sehari-hari. Selain itu, pada asal hidupnya, baik moluska air tawar; darat; ataupun air laut, tidak memiliki perbedaan pada jenis antioksidan. Hal yang membedakan berdasarkan asal hidupnya terdapat pada jumlah data yang meneliti moluska berdasarkan asal hidupnya dengan moluska air laut memiliki jumlah data terbesar.

Pada tabel terdapat 4., jenis senyawa antioksidan yang teridentifikasi, yaitu: biopeptida, polisakarida dan turunannya, enzim, dan senyawa metabolisme sekunder. Sedangkan jumlah data yang ditemukan paling banyak menunjukkan aktivitas antioksidan dari biopeptida ataupun ikatan peptida, dengan sejumlah data yang tersisa menunjukkan aktivitas antioksidan tanpa diketahui secara jelas jenis antioksidan penyusunnya. Metode pengujian yang paling banyak digunakan adalah DPPH, ABTS, FRAP, dan OH *scavenging* yang akan dibahas secara mendalam pada bab selanjutnya. Pengukuran jenis antioksidan dinyatakan dengan IC50 ataupun persentase aktivitas antioksidan dalam menangkal radikal bebas dan dibandingkan dengan antioksidan murni seperti vitamin E.

Tabel 3. Senyawa Antioksidan pada Moluska

Jenis Antioksidan	Moluska	Asal Moluska	Aktivitas Tertinggi (IC50)	Referensi
Flavonoid dan Alkaloid	<i>Solen spp.</i> (kerang pisau)	Moluska Air Laut	DPPH: 2008,52 ppm	(Nurjanah <i>et al.</i> , 2011)
Biopeptida (Trp-Pro-Pro)	<i>Tegillarca granosa</i> (kerang darah)	Moluska Air Laut	DPPH: 1,388 mg/ml HO: 0,406 mg/ml O ₂ : 0,536 mg/ml ABTS: 2,75 mg/ml	(Chi, Hu, Wang, Li, & Ding, 2015)
Biopeptida (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys)	<i>Saccostrea culculata</i> (tiram)	Moluska Air Laut	DPPH: 83.79 ± 0,53 %	(Umayaparvathi <i>et al.</i> , 2014)
L-DOPA, dopamine, taurine, melanine	<i>Sepia officinalis</i> (tinta sotong)	Moluska Air Laut	DPPH: 83,06% TBAR: 176,77	(Fahmy, 2014)
Taurine, GSH (glycine, glutamine, cysteine)	<i>Coelatura aegyptiaca</i> (kerang air tawar)	Moluska Air Tawar	DPPH: 73,14% TBAR: 177.23	(Fahmy, 2014)
CFPS (<i>Corbicula fluminea</i> Polysaccharide Sulfate)	<i>Corbicula fluminea</i> (kerang Asia)	Moluska Air Tawar	Superoxide radical scavenging: 94,91 ± 0,39	(Liao <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Helix aspersa maxima</i> (Telur siput darat)	Moluska Darat	FRAP: 2,98 ± 0,09 ABTS: 1,17 ± 0,15	(Gorka, Oklejewicz, & Duda, 2017)
Biopeptida (Ile-Leu-Lys-Met-Phe-Thr-Val)	<i>Lamellibranchia: Unionidae</i> (kerang air tawar)	Moluska Air Tawar	DPPH: 81,3% Hydroxyl radical scavenging: 50,1%	(Zhouyong <i>et al.</i> , 2017)

				Superoxide radical scavenging: 72,9% FRAP: 0,634 Inhibition of linoleic acid oxidation: lebih tinggi dibandingkan Vc dan GSH	
		<i>Pleuroploca trapezium</i> (gastropoda)	Moluska Air Laut	DPPH: 4021 µg/ml	(Anand, Kumaran, Shanthini, & Management, 2010)
		<i>Hemifusus pugilinus</i> (gastropoda laut)	Moluska Air Laut	DPPH: 95,16 µg/ml NO scavenging: 75,85 µg/ml Hydrogen peroxide scavenging: 95,39 µg/ml Superoxide radical scavenging: 83,36 µg/ml	(Arumugasamy & Cyril, 2017)
Oligopeptida (Gly-Asp-Gln-Gln-Lys)		<i>Ruditapes philippinarum</i> (short-necked clam)	Moluska Air Laut	DPPH: 66,09 ± 1,2%	(Li <i>et al.</i> , 2015)
Ekstrak protein kasar		<i>Perna viridis</i> Linnaeus (kerang hijau)	Moluska Air Laut	DPPH: 76,9% TRP: 27,8 µg Hydrogen peroxide scavenging: 88,12% Nitrous oxide scavenging: 62,5%	(Kulkarni, 2014)
Biopeptida (Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu)		<i>Dosidicus gigas</i> (jumbo squid)	Moluska Air Laut	In vitro lipid peroxidation inhibition: 82%	(Mendis, Rajapakse, Byun, & Kim, 2005)

			Hydroxyl radical scavenging: 100,72 Carbon-centered radicals scavenging: 141,01	
Hyaluronic acid	<i>Amassium pleuronectus</i> (Bivalvia)	Moluska Air Laut	ABTS: 71,35% DPPH: 54,42% Hydroxyl radicals: 63,42%	(Kanchana, Arumugam, Giji, & Balasubramanian, 2013)
	<i>Loligo duvauceli</i> Orbigny (cumi-cumi)	Moluska Air Laut	DPPH: $58 \pm 0,05$	(Shabeena & Naqash, 2013)
	<i>Donax cuneatus</i> Linnaeus (kerang)	Moluska Air Laut	DPPH: $26 \pm 0,10$	(Shabeena & Naqash, 2013)
Biopeptida	<i>Galatea paradoxa</i> (bivalvia air tawar)	Moluska Air Tawar	DPPH: 56,77%	(Borquaye, Darko, Ocansey, & Ankomah, 2015)
Biopeptida	<i>Patella rustica</i> (gastropoda air laut)	Moluska Air Laut	DPPH: 79,77%	(Borquaye <i>et al.</i> , 2015)
Antioksidan enzimatik	<i>Lobiger serradifalci</i> (opisthobrancia laut)	Moluska Air Laut	SOD activity: 27 ± 2 IU/mg CAT activity: $217 \pm 3,5$ IU/mg GSH-Px activity: $3,9 \pm 0,3$ IU/mg LPO assay: $58,3 \pm 3,5$ nmol MDA/g GSSG assay: $0,04 \pm 0,01$ nmol/mg wet weight	(Cavas, Yurdakoc, & Yokes, 2005)
Antioksidan enzimatik	<i>Oxyntoe olivacea</i> (opisthobrancia laut)	Moluska Air Laut	SOD activity: $14 \pm 1,5$ IU/mg CAT activity: $180,2 \pm 5$ IU/mg GSH-Px activity: $5,9 \pm 0,8$ IU/mg LPO assay: $48 \pm 2,7$ nmol MDA/g	(Cavas <i>et al.</i> , 2005)

				GSSG assay: $0,08 \pm 0,02$ nmol/mg wet weight	
Biopeptida dan Polifenol	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (black mussel)	Moluska Air Laut		β -carotene linoleate model system: $87,7 \pm 7,1$ NO ⁻ test: $59,0 \pm 4,9$ ABTS, TEAC: $3,40 \pm 0,3$	(Gorinstein <i>et al.</i> , 2003)
Pepsin Hydrolysate	<i>Sepia pharaonic</i> (cuttlefish)	Moluska Air Laut		ABTS: 129,38 FRAP: 21.75 mg/ml DPPH: 2,08 mg/ml Hydroxyl radical scavenging: 3,67 mg/ml	(Siahpoosh & Alikhani, 2016)
Antioksidan enzimatik	<i>Ruditapes decussatus</i> (Carpet shell)	Moluska Air Laut		SOD activity: 84 ± 4 Catalase activity: 91 ± 5 Glutathione peroxidases activities: 0.0099 ± 0.0016 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ Lipid peroxidation: 373.8 ± 45.2 $\text{nmol g}^{-1} \text{protein}$	(Geret, Serafim, Barreira, & Bebianno, 2002)
Chitin	<i>Chiton Mollusks</i>	Moluska Air Laut		DPPH: 125 $\mu\text{g/ml}$ (75%) ABTS: 250 $\mu\text{g/ml}$ (73%)	(Rasti, Parivar, Baharara, Iranshahi, & Namvar, 2017)
Melanin-free ink	<i>Loligo formosana</i> (splendid squid)	Moluska Air Laut		DPPH: $179,6 \pm 2,1$ TE/g protein ABTS: $957,8 \pm 89,3$ TE/g protein FRAP: $171,2 \pm 7,3$ TE/g protein Metal Chelating: 4 ± 1.2 $\mu\text{mol EE/g protein}$	(Vate & Benjakul, 2013)

Keterangan:



: Menunjukkan tidak dilakukan proses identifikasi senyawa antioksidan pada sampel.

3.1 Faktor yang Mempengaruhi Identifikasi Antioksidan

Pada proses identifikasi antioksidan, terdapat dua faktor yang mempengaruhi yaitu pada bagaimana metode preparasi tersebut diaplikasikan serta pada matriks yang mempengaruhi. Kemudian, dari kedua pengaruh tersebut akan dikaitkan dengan penggunaan metode yang digunakan pada bab selanjutnya. Sehingga diketahui jenis metode yang paling tepat dengan kedua faktor yang mempengaruhi proses tersebut.

Makanan, berdasarkan matriks penyusunnya, secara umum dibagi menjadi 4 kategori: a) berserat (*fibrous structure*) terdiri atas makromolekul pada jaringan yang memiliki fungsi tertentu (contohnya pada otot) dan saling berikatan dengan intensitas yang berbeda pada interaksi interfasi; b) berdaging (*fleshy structure*), pada tanaman terdiri dari gabungan *hydrated cells* berikatan dengan dinding sel, yang memiliki tekanan turgor (contohnya umbi-umbian, buah-buahan, sayur mayur); c) embrio terenkapsulasi pada tanaman yang mengandung dispersi dari pati, protein, dan lemak yang berada dalam *discrete packet* (contohnya pada biji-bijian dan kacang-kacangan); d) kompleks fluida yang unik seperti susu. Konsep matriks pada makanan sendiri merupakan pernyataan bahwa nutrisi yang terkandung berada dalam media kontinu yang besar, yang secara alami berasal dari sel (buah-buahan dan sayuran) atau berasal dari hasil pemrosesan, Contohnya pada nutrisi yang ditemukan pada molekul individual (karotenoid pada wortel) atau kompleks matriks berada pada granula pati yang membengkak dan protein (*isoflavone* pada produk yang dipanggang). Matriks juga menentukan fungsi dari suatu pangan (Parada & Aguilera, 2007).

Salah satu cara untuk menentukan fungsi dari bahan pangan berdasarkan matriks penyusunnya adalah dengan proses pengujian, yang diawali dengan metode preparasi sampel. Metode yang banyak digunakan untuk preparasi sampel salah satunya adalah proses ekstraksi. Ekstraksi merupakan proses yang digunakan untuk memurnikan atau mengumpulkan produk khusus. Selama proses ekstraksi, solven yang digunakan dicampur dengan substrat untuk proses pengekstraksian. Lalu substrat akan bereaksi dan membentuk campuran yang mengandung produk yang dituju. Seiring perkembangan teknologi, ekstraksi tidak hanya berfokus pada

penggunaan solven, tetapi juga pada penggunaan alat ataupun penambahan bahan lain seperti enzim (Ledgard, 2014).

Berdasarkan hasil data yang sudah penulis kumpulkan pada tabel 1.; tabel 2.; tabel 3.; dan tabel 4., maka jenis antioksidan akan terbagi menjadi: biopeptida, antioksidan in vitro, polisakarida, dan senyawa metabolisme sekunder yaitu flavonoid; alkaloid; polifenol. Berdasarkan keempat jenis antioksidan tersebut, akan dibahas secara detail pengaruh matriks dan metode preparasi pada biopeptida dan polisakarida sebagai data yang paling dominan dengan jenis pengujian dan karakteristik yang mirip. Pengukuran aktivitas antioksidan dikatakan berhasil ketika nilai IC50 kurang dari 50 mg/ml atau nilai persentase lebih dari 50%. Pada tabel, semua data memiliki nilai IC50 yang tinggi, dan dapat dikatakan bahwa moluska memiliki potensi sebagai sumber antioksidan.

3.1.1 Biopeptida

3.1.1.1 Matriks Bahan

Berdasarkan data pada tabel 4., menunjukkan hasil ekstraksi jaringan dari moluska berupa ikatan peptida. Pada hasil ekstraksi dan fraksinasi, dengan berat molekul yang lebih kecil mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar. Terlihat pada sampel *Tegillarca granosa*, didapatkan dua sumber antioksidan dengan berat molekul berbeda. Aktivitas tertinggi pada sampel *Tegillarca granosa* terdapat pada BCP-A (*Blood Clam Peptide A*) dengan berat molekul paling kecil dibandingkan dengan BCP-B (*Blood Clam Peptide B*). Terlihat pada pengujian DPPH, ABTS dan *hydroxyl radical scavenging*, hasil IC50 BCP-A menunjukkan nilai yang lebih sedikit. Hal ini menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dalam mereduksi radikal bebas (Chi *et al.*, 2015).

Ditemukan kesamaan pada sampel *Dosidicus gigas*, bahwa ekstrak protein dengan berat molekul lebih sedikit memiliki nilai IC₅₀ yang lebih kecil dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pada metode uji *hydroxyl radical scavenging*. Namun, kedua fragmen protein tidak menunjukkan aktivitas antioksidan dalam pengujian FRAP (Mendis *et al.*, 2005). Hal yang sama ditunjukkan pada sampel *Saccostrea culiculata*. Pada uji DPPH, fragmen protein SCAP1

menunjukkan persentase aktivitas yang lebih tinggi dengan berat molekul yang lebih rendah dibandingkan 2 fragmen protein lainnya (Umayaparvathi *et al.*, 2014). Berat molekul yang berbeda pada peptida disebabkan oleh panjang pendeknya ikatan yang menyusun serta molekul penyusunnya.

Umayaparvathi *et al.* (2014), mengemukakan bahwa peptida dengan berat molekul tertentu menentukan aktivitas antioksidan pada sampel. Peptida dengan berat molekul lebih rendah, terdiri dari 5-16 asam amino penyusun, memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Hal ini ditunjukkan pada sampel *Ruditapes*, fragmen protein dengan berat molekul yang lebih rendah memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Semakin pendek rantai penyusun, peptida memiliki aktivitas biologis yang lebih besar daripada satu ikatan besar protein dengan rantai panjang (Li *et al.*, 2015). Didukung oleh teori Moosmann & Behl (2002) dalam Zhouyong *et al.* (2017) bahwa semakin kecil ukuran rantai peptida, maka kemampuan aksesibilitas dalam sistem antioksidan lebih baik daripada rantai peptida yang lebih besar.

Pada sampel ekstrak peptida *Dosidicus gigas* dan *Lamellibranchia*, ikatan peptida dengan berat molekul terendah memiliki aktivitas tertinggi. Terutama pada sampel *Lamellibranchia*, ikatan peptida hasil fraksinasi memiliki kemampuan aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan ikatan peptida ekstrak kasar tanpa proses fraksinasi. Hal ini juga menunjukkan bahwa berat molekul protein yang mengalami fraksinasi, semakin kecil ukurannya, memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik. Proses fraksinasi juga memudahkan dalam meneliti asam amino penyusun ikatan peptida (Borquaye *et al.*, 2015; Mendis *et al.*, 2005; Zhouyong *et al.*, 2017). Peptida yang memiliki aktivitas antioksidan diketahui memiliki berat molekul 500–1400 Da dan terdiri dari 2–20 asam amino (Li *et al.*, 2015; Umayaparvathi *et al.*, 2014).

Pengaruh berat molekul pada matriks biopeptida berkaitan erat dengan jenis asam amino penyusun rantai tersebut. Beberapa jenis asam amino seperti Tyr, Met, Pro, Lys, His, Cys, Gly, dan Trp diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Pada asam amino yang bersifat hidrofobik (*alanine, valine, isoleusine, leusin, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, proline, methionine,*

dan cysteine) mampu berinteraksi dengan asam lemak. Peningkatan interaksi dengan asam lemak menyebabkan peningkatan solubilitas peptida pada lemak, juga meningkatkan proteksi dalam mencegah oksidasi oleh asam lemak bebas. Meningkatnya hidrofobisitas meningkatkan kemampuan antioksidan dan proses emulsifikasi, juga melindungi asam linoleat dari radikal bebas larut lemak melalui donor foton. Selain itu peptida hidrofobik juga memiliki efek sinergis dengan komponen antioksidan lain dengan sifat kelarutan yang sama, seperti α -tocopherol (Mendis *et al.*, 2005; Zhouyong *et al.*, 2017). Hal ini ditunjukkan pada fragmen protein BCP-A yang mengandung asam amino Trp dan Pro. Fragmen protein memiliki kemampuan untuk meningkatkan interaksi antara peptida dengan asam lemak serta secara signifikan meningkatkan periode induksi antioksidan asam linoleat (Chi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Umayaparvathi *et al.*, 2014).

Asam amino lain yang memiliki aktivitas antioksidan adalah His. Asam amino ini memiliki kemampuan untuk donasi proton dari gugus midazole. Proline juga memiliki aktivitas antioksidan, yaitu pada ikatan Pro-His-His. Sedangkan Trp, asam amino aromatik, memiliki aktivitas antioksidan karena memiliki cincin indole yang berfungsi sebagai donor hidrogen. Selanjutnya pada asam amino Cys, aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya gugus SH yang berfungsi sebagai donor hidrogen. Jika Cys dan Trp berada pada satu rantai peptida yang sama, akan berkontribusi secara signifikan pada aktivitas antioksidan (Umayaparvathi *et al.*, 2014; Zhouyong *et al.*, 2017; Zou *et al.*, 2016).

Pada filum Cephalopoda tinta diketahui memiliki fungsi sebagai bioaktif yang dapat membunuh sel kanker, meningkatkan jumlah leukosit dan produksi tromboksin, serta antivirus. Antioksidan juga merupakan salah satu fungsi bioaktif pada tinta Cephalopoda, disebabkan karena adanya biopeptida. (Fahmy, 2014; Vate & Benjakul, 2013). Pada sampel tinta *Sepia officinalis*, ditemukan adanya kandungan protein seperti L-DOPA ($2,18 \pm 0,8$ nmol/mg protein), dopamine ($0,06 \pm 0,02$ nmol/mg protein), dan taurine (Fahmy, 2014). Hal ini didukung dengan penelitian ekstrak kasar protein pada sampel tinta *Loligo formosana* tanpa melanin, menunjukkan aktivitas antioksidan pada protein tinta cumi (Vate & Benjakul, 2013).

L-DOPA merupakan protein yang diketahui sebagai bagian dari pengobatan penyakit Parkinson, dan memiliki manfaat mencegah terbentuknya radikal bebas yang mengakibatkan terbentuknya Parkinson. L-DOPA merupakan prekursor dari Dopamine. Sedangkan dopamine berperan dalam kontrol motorik, kognitif, perilaku dan fungsi endokrin dalam sistem saraf pusat (SSP). Baik L-DOPA ataupun Dopamine memiliki efek terhadap kondisi fisiologis serta mampu mendonorkan ion hidrogen pada gugus hidroksil (Dorszewska *et al.*, 2014; Fahmy, 2014; Pellicano *et al.*, 2011; Vate & Benjakul, 2013). Sedangkan Taurine adalah asam amino yang mengandung sulfur, berfungsi sebagai antioksidan (Fahmy, 2014). Seperti sampel ekstrak peptida lainnya, berat molekul juga mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pada ekstrak protein dengan berat molekul <3kDa sampel *Loligo formosana*, memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada hasil fraksinasi lain yang memiliki berat molekul lebih tinggi (Vate & Benjakul, 2013).

3.1.1.2 Metode Preparasi

Pada proses preparasi tabel 4., semua sampel, kecuali sampel berupa tinta, mengalami proses ekstraksi dan hidrolisis untuk mendapatkan biopeptida. Derajat hidrolisis (DH) pada saat preparasi, mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pada sampel gelatin kulit *Dosidicus gigas* menggunakan beberapa jenis enzim. Trypsin memiliki DH yang lebih besar dibandingkan dengan jenis enzim lainnya, hal ini ditunjukkan dengan hasil hidrolisis enzim trypsin memiliki ikatan peptida lebih pendek. DH juga berhubungan dengan berat molekul ikatan peptida, ketika ikatan peptida lebih pendek maka berat molekul akan lebih kecil (Mendis *et al.*, 2005). Sedangkan untuk sampel tinta tidak melalui proses ekstraksi, hanya dilakukan identifikasi molekul penyusun baik pada *Loligo formosana* ataupun *Sepia officinalis*.

Tabel 4. Aktivitas Antioksidan pada Biopeptida

Moluska	Sumber Antioksidan	Antioksidan	Aktivitas Antioksidan				Referensi
			DPPH	FRAP	ABTS	HO	
<i>Tegillarca granosa</i>	Ekstraksi enzimatik dan purifikasi bagian daging yang sudah dihilangkan bagian lemak, kemudian isolasi menggunakan HPLC dan identifikasi asam amino penyusun dengan Applied BioSystems Procise 494 protein sequencer	BCP-A (Trp-Pro-Pro) (398,44 Da)	IC50: 1,388 mg/ml	-	IC50: 0.315 mg/ml	IC50: 0.406 mg/ml	(Chi <i>et al.</i> , 2015)
		BCP-B (Gln-Pro) (399,27 Da)	IC50: 3,522 mg/ml	-	IC50: 1.406 mg/ml	IC50: 1.750 mg/ml,	
<i>Saccostrea culiculata</i> (oyster)	Hidrolisis keseluruhan jaringan tanpa lemak dan tanpa kotoran menggunakan enzim protease dari <i>Bacillus cereus</i> SU12. Isolasi menggunakan HPLC dan identifikasi menggunakan UV detector pada 220nm	SCAP1 (Leu-Ala-Asn- Ala-Lys) (515.29 Da)	83.79 ± 0.53 %	-	-	-	(Umayaparvathi <i>et al.</i> , 2014)
		SCAP 3 (Pro-Ser-Leu- Val-Gly-Arg- Pro-Pro-Val- Gly-Lys-Leu- Thr-Leu) (1432.89 Da)	75.48 ± 1.02 %	-	-	-	
		SCAP 7 (Val-Lys-Val- Leu-Leu-Glu- His-Pro-Val- Leu) (1145.75 Da)	76.62 ± 0.72 %	-	-	-	

<i>Sepia officinalis</i> (cuttlefish ink)	Diambil bagian tinta, kemudian dilarutkan pada air suling dengan volume yang sama	L-DOPA, dopamine, taurine, melanine	83,06%	-	-	-	(Fahmy, 2014)
<i>Coelatura aegyptiaca</i> (freshwater mussel)	Ekstraksi kasar seluruh jaringan menggunakan boiler dengan aquades selama 3 x 30 menit	Taurine, GSH (glycine, glutamine, cysteine)	73,14%	-	-	-	(Fahmy, 2014)
<i>Lamellibranchia: Unionidae</i> (freshwater mussel)	Bagian daging dihilangkan bagian organ dalam dan cangkangnya. Kemudian diekstraksi menggunakan ultrasound-assisted enzymatic (neutrase). Selanjutnya dilakukan ultrafiltrasi pada sampel <3 Da dan analisis asam amino untuk ikatan peptida dan dibandingkan antara ekstrasi pertama dengan hasil ultrafiltrasi	<3 kDa (EAA-18,27%; HAA-17,75%; AAA-2,37%; PCAA 7,78%; NCAA 10,53%)	78,8%	0,441 at 2 mg/ml	-	196% at 2 mg/ml	(Zhouyong <i>et al.</i> , 2017)
			81,3%	0,634 at 2 mg/ml	-	50,1% at 2 mg/ml	
<i>Ruditapes philippinarum</i> (short-necked clam)	Ekstrak daging menggunakan orthogonal array design dengan enzim trypsin kemudian di ultrafiltrasi menggunakan Sephadex G-25 gel filtration column dan di purifikasi menggunakan HPLC.	Oligopeptida (Gly-Asp-Gln- Gln-Lys) (575.45Da)	0.739 mg/mL	1,25 at 2 mg/ml	-	-	(Li <i>et al.</i> , 2015)
<i>Perna viridis</i> Linnaeus (green mussel)	Ekstrak kasar seluruh jaringan yang sudah dicuci dan dipisahkan dari cangkang menggunakan methanol dan rotary evaporator. Kemudian dilakukan estimasi berat molekul	Ekstrak kasar protein (Amide A, Amide B, Amide I, Amide	76,9% at 100 µg/ml	88,12% at 100 µg/ml	-	-	(Kulkarni, 2014)

	dan analisis asam amino menggunakan FT-IR spectroscopy	II, Amide III, Amide IV)					
<i>Dosidicus gigas</i> (jumbo squid)	Ekstrak protein gelatin bagian kulit dengan menggunakan 3 jenis enzim berbeda (trypsin, α -chymotrypsin, dan pepsin), dengan derajat hidrolisis paling tinggi terdapat pada trypsin. Kemudian dilakukan purifikasi menggunakan HPLC dan karakterisasi asam amino menggunakan automatic amino acid analyzer (Biochrom 20)	P1 (Phe-Asp-Ser-Gly-Pro-Ala-Gly-Val-Leu) (880.18 Da)	-	0	-	IC50: 90.90 μ M	(Mendis <i>et al.</i> , 2005)
		P2 (Asn-Gly-Pro-Leu-Gln-Ala-Gly-Gln-Pro-Gly-Glu-Arg) (1241.59 Da)	-	0	-	IC50: 100.72 μ M	
<i>Galatea paradoxa</i> (bivalvia air tawar)	Bagian daging dipisahkan dari cangkangnya, lalu dilakukan ekstraksi protein secara kasar menggunakan asam asetat.	Biopeptida	56,77% at 0.39 mg/mL	-	-	-	(Borquaye <i>et al.</i> , 2015)
<i>Patella rustica</i> (gastropoda air laut)	Bagian daging dipisahkan dari cangkangnya, lalu di ekstraksi protein secara kasar menggunakan asam asetat.	Biopeptida	79,77% at 0.39 mg/mL	-	-	-	(Borquaye <i>et al.</i> , 2015)
<i>Sepia pharaonic</i> (cuttlefish)	Ekstrak keseluruhan jaringan pada sotong dengan secara enzimatik menggunakan pepsin.	Pepsin Hydrolysate	IC 50: 2,08 mg/ml	EC50: 21.75 mg/ml	IC50: 129,38 mg/ml	IC50: 3,67 mg/ml	(Siahpoosh & Alikhani, 2016)
<i>Loligo formosana</i> (splendid squid)	Tinta cumi yang sudah dipisahkan dari kelenjarnya, di-ionisasi dengan air dingin untuk menghilangkan bagian melaninnya, menyisakan bagian protein. Kemudian di ultrafiltrasi tanpa diidentifikasi asam amino penyusunnya	Melanin-free ink (Biopeptida <3kDa)	179,6 \pm 2,1 TE/g	171,2 \pm 7,3 TE/g protein	957,8 \pm 89,3 TE/g	-	(Vate & Benjakul, 2013)

3.1.2 Polisakarida

3.1.2.1 Matriks Bahan

Pada tabel 5., menunjukkan ekstraksi polisakarida dan turunannya pada moluska. Pada hasil ekstraksi, berat molekul fragmen yang lebih kecil mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar. Terlihat pada sampel *Corbicula fluminea* dengan dua sumber antioksidan memiliki berat molekul berbeda, berasal dari dua metode ekstraksi yang berbeda. Aktivitas antioksidan tertinggi terdapat pada CFPS (*Corbicula fluminea Polysaccharide Sulfate*) menggunakan metode *ultrasonic assisted enzymatic extraction*. Ekstrak kemudian diuji menggunakan uji *superoxide radical scavenger*, didapatkan hasil 24.48% pada sampel EP-us (dengan metode ultrasonic) dan 15.79% pada sampel EP (dengan metode enzimatik) masing-masing pada konsentrasi 6 mg/ml (Liao *et al.*, 2015).

Didukung dengan pengujian pada *Dendrobium* yang merupakan bahan nabati. Hasil fraksinasi dengan berat molekul terendah memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan 11,4 kDa (Luo *et al.*, 2010). Didukung oleh teori J. Wang *et al.* (2016), bahwa salah satu faktor penting yang mempengaruhi aktivitas antioksidan pada polisakarida adalah berat molekul. Ketika berat molekul lebih rendah, maka lebih banyak menerima radikal bebas, sehingga dapat mencapai titik stabil

Selain berat molekul, monosakarida atau disakarida penyusun polisakarida juga mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pada sampel *Corbicula fluminea* terdapat dua fragmen hasil ekstraksi secara enzimatik dan ultrasonik. Pada kedua fragmen tersebut, struktur penyusun polisakarida tidak mengandung gula pereduksi dan terdiri dari *fucose*, *arabinose*, *mannose*, *glucose*, *galactose*, *glucuronic acid*, dan *sulfonic acid* (Liao *et al.*, 2015). Pada sampel bahan nabati, *Ginkgo biloba*, didapatkan dua jenis polisakarida. Pada polisakarida dengan pH netral, molekul penyusun antioksidan terdiri dari *rhamnose*, *arabinose*, *mannose*, *glucose*, dan *galactose*. Sedangkan pada polisakarida dengan pH asam, terdiri atas *mannose*, *rhamnose*, *glucuronic acid*, *galacturonic acid*, *galactosamine*, *glucose*, *galactose*, *xylose*, *arabinose*, and *fucose* (Chen *et al.*, 2012). Hal ini didukung pula pada sampel nabati

Dendrobium nobile Lindl, bahwa sampel dengan kandungan *rhamnose* memiliki aktivitas antioksidan (Luo *et al.*, 2010).

Selanjutnya, *hyaluronic acid* (HA) pada *Amussium pleuronectus* menunjukkan aktivitas antioksidan baik pada uji DPPH, *hydrogen radical scavenging*, ataupun ABTS. *Hyaluronic acid* merupakan turunan polisakarida GAG (Glucuronic acid), terbentuk atas rantai disakarida berulang yaitu N-asetil-D-glukosamin dan D-glucuronic acid yang berikatan glikosidik pada β (1,4) dan β (1,3). *Hyaluronic acid* memiliki berat molekul berkisar pada 104-107 Da. HA berperan sebagai aktivator dan modulasi respon peradangan, juga dalam mencegah aktivitas ROS dalam tubuh seperti radikal hidroksil (\bullet OH). (Liao *et al.*, 2015).

Chitosan pada Chiton merupakan turunan dari chitin yang mengalami proses deasetilasi. Dibandingkan dengan sampel komersial, chitosan memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Hal ini ditunjukkan pada uji DPPH dan ABTS dengan 125 μ g/ml (75% at 1000 μ g/ml) dan 250 μ g/ml (73% at 1000 μ g/ml). Chitosan merupakan rantai linier polisakarida terdiri atas ikatan (1-4) pada monomer *2-amino-2-deoxy-b-D-glucopyranose*. Pembentukan chitosan dilakukan melalui proses deasetilasi chitin menggunakan media basa kuat (Rasti *et al.*, 2017).

3.1.2.2 Metode Preparasi

Sama seperti biopeptida, proses pengekstrasian juga berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan polisakarida. Pada proses ekstraksi polisakarida, terutama pada sampel hewani dengan kandungan protein tinggi, biasanya cukup sulit untuk menganalisa komposisi polisakarida. Maka diperlukan proses enzimatis untuk proses deproteinasi pada polisakarida. Pada sampel *Corbicula fluminea* dan *Amassium pleuronectus* proses deproteinase dilakukan dengan menggunakan enzim papain.. Papain merupakan enzim thiol protease, biasa digunakan untuk proses preparasi polisakarida (Kanchana *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2012). Sedangkan pada sampel chitosan proses deproteinasi dilakukan dengan menggunakan NaOH untuk memecah ikatan ester antara asam amino dengan chitin (Percot *et al.*, 2003; Rasti *et al.*, 2017).

UAEE (*Ultrasonic assisted enzymatic extraction*) merupakan metode dengan efek sinergis antara enzim dan *ultrasound* pada bagian permukaan sel yang meningkatkan permeabilitas sel dan menghasilkan lebih banyak polisakarida. Semakin tinggi hasil ekstraksi, maka semakin tinggi proporsi polisakarida yang terlarut dalam media cair. Kemampuan ekstraksi pada UAEE mampu medepolimerisasi komponen menjadi fragmen dengan berat molekul yang semakin rendah. Sehingga sampel yang berasal dari proses UAEE akan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Liao *et al.*, 2015).



Tabel 5. Aktivitas Antioksidan pada Polisakarida

Moluska	Sumber Antioksidan	Jenis Antioksidan	Aktivitas Antioksidan				Referensi
			DPPH	FRAP	ABTS	HO	
<i>Corbicula fluminea</i> (Asian clam)	Antioksidan didapatkan dari ekstraksi menggunakan enzim papain (sampel 1) dan menggunakan metode ultrasonic dan diekstraksi menggunakan buffer sodium karbonat (sampel 2).	CFPS (<i>Corbicula fluminea</i> Polysaccharide Sulfate) – Enzyme assisted extraction (500-620 kDa)	-	-	-	-	(Liao <i>et al.</i> , 2015)
		CFPS (<i>Corbicula fluminea</i> Polysaccharide Sulfate) – Ultrasonic assisted enzymatic extraction (343-473 kDa)	-	-	-	-	
<i>Amassium pleuronectus</i> (Bivalvia)	Ekstraksi GAG (Glycosaminoglycans) dari bagian jaringan tanpa lemak menggunakan enzim papain. Kemudian dilakukan fraksinasi untuk mendapatkan kandungan <i>hyaluronic acid</i> .	Hyaluronic acid	54,42%	-	71,35%	63,42%	(Kanchana <i>et al.</i> , 2013)
Chiton Mollusks	Cangkang chiton dipisahkan dari bagian tubuh. Kemudian dikeringkan dan dihaluskan menjadi bubuk. Selanjutnya, bubuk cangkang	Chitosan	125 µg/ml (75% at 1000 µg/ml)	-	250 µg/ml (73% at 1000 µg/ml)	-	(Rasti <i>et al.</i> , 2017)

didemineralisasi

menggunakan HCl dan deproteinasi menggunakan NaOH untuk mendapatkan sampel chitin. Selanjutnya sisa sampel chitin yang tidak diujikan dan deasetilasi menggunakan 45% NaOH pada suhu 110°C. untuk mendapatkan sampel chitosan.

Chitosan komersial

500 µg/mL

(68% at

1000 µg/ml)

1000

µg/mL

(50% at

1000

µg/ml)



3.2 Jenis Antioksidan Lain pada Moluska

3.2.1 Flavonoid, Alkaloid, dan Polifenol

Pada tabel 6., ditemukan aktivitas antioksidan berasal dari senyawa flavonoid, alkaloid, dan polifenol. Pada sampel *black mussel*, ditemukan senyawa polifenol. Polifenol merupakan komponen yang terdiri dari beberapa kelas seperti flavonol; isoflavones; dan masih banyak lagi. Polifenol berasal dari hasil metabolisme sekunder pada tumbuhan. Adanya senyawa polifenol dalam *black mussel* berperan dalam mencegah penyakit degeneratif, sebagai anti-alergenik, antimikroba, antioksidan, dan anti-inflammasi. Senyawa polifenol dalam tubuh moluska disebabkan karena sumber makanan yang mengandung senyawa tersebut (Gorinstein *et al.*, 2003; Parada & Aguilera, 2007).

Pada sampel kerang pisau, ditemukan senyawa flavonoid dan alkaloid. Alkaloid dan flavonoid merupakan senyawa polifenol yang berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh (Parada & Aguilera, 2007). Riguera (1997) menyatakan bahwa, komponen polar yang terdapat pada invertebrata laut didominasi oleh garam-garam alkaloid, asam amino, polihidrosteroid dan saponin.

Hasil ekstraksi pada senyawa antioksidan tabel 6. ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain kondisi alamiah senyawa tersebut, metode ekstraksi, ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, serta perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Harborne 1987; Darusman *et al.*, 1995 dalam Nurjanah *et al.*, 2011). Pada sampel kerang pisau aktivitas antioksidan tertinggi dengan penggunaan pelarut kloroform menggunakan uji DPPH sebesar 2008,52 ppm. Selanjutnya pada sampel *black mussel* menggunakan uji ABTS didapatkan nilai sebesar $0,65 \pm 0,06$.

Tabel 6. Aktivitas Antioksidan pada Senyawa Metabolisme Sekunder

Moluska	Sumber Antioksidan	Jenis Antioksidan	Aktivitas Tertinggi				Referensi
			DPPH	FRAP	ABTS	HO	
Kerang Pisau (<i>Solen spp.</i>)	Ekstraksi bahan aktif menggunakan tiga pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu kloroform p.a. (non polar), etil asetat p.a. (semi polar) dan metanol p.a. (polar).	Flavonoid dan Alkaloid	2008,52 ppm (pada ekstrak kloroform)	-	-	-	(Nurjanah <i>et al.</i> , 2011)
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (black mussel)	Lemak di ekstraksi dari bagian daging yang sudah dikeringkan dengan aseton selama 24 jam pada suhu 20°C dan dikeringkan menggunakan <i>air dried</i> . Kemudian sampel tanpa lemak diekstraksi kembali menggunakan 3 jenis sampel dan suhu yang berbeda.	Polifenol	-	-	0.65±0.06	-	(Gorinstein <i>et al.</i> , 2003)

3.2.2 Aktivitas Enzimatik (Antioksidan in vitro)

Aktivitas enzimatik merupakan bagian dari antioksidan in vitro dalam tubuh hewan. Pada ketiga sampel, penelitian antioksidan digunakan untuk mengetahui mekanisme stress oksidatif pada moluska. Pada sampel *Lobiger serradifalci* dan *Oxynae olivacea* stress oksidatif disebabkan adanya pengaruh perubahan suhu. Sedangkan pada *Ruditapes decussatus* stress oksidatif dipengaruhi logam seperti Cd, Pada antioksidan in vitro jenis uji pengukuran didasarkan pada jenis enzim. Hal ini disebabkan karena berbeda jenis enzim, memiliki cara menangkal radikal bebas yang berbeda pula. Pada masing-masing sampel, *Lobiger serradifalci*; *Oxynae olivacea*; dan *Ruditapes decussatus*, pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada enzim katalase (CAT), *Superoxide dismutase* (SOD), dan GSH (*Glutathione peroxidase*). SOD merupakan metaloenzim yang berfungsi sebagai katalase proses dismutase anion superoksida menjadi hidrogen peroksida. Katalase (CAT) merupakan enzim yang berfungsi mengurangi dan mengubah H₂O₂ menjadi air. Selanjutnya, enzim GSH memiliki fungsi detoksifikasi peroksida dalam sel. Mekanisme uji LPO berfungsi untuk mengetahui aktivitas antioksidan in vitro dalam mencegah proses peroksidase lemak, sekaligus sebagai *oxidative stress marker* (Cavas *et al.*, 2005; Geret *et al.*, 2002). Berdasarkan hasil pengamatan, diketahui pada ketiga sampel memiliki aktivitas enzimatik tertinggi pada pengujian CAT. Pada sampel *Lobiger serradifalci* nilai aktivitas enzimatik sebesar $217 \pm 3,5$ IU/mg. Pada *Oxynae olivacea* nilai aktivitas enzimatik sebesar $180,2 \pm 5$ IU/mg. Selanjutnya pada sampel *Ruditapes decussatus* nilai aktivitas enzimatik sebesar 91 ± 5 IU/mg. Pada masing-masing sampel secara berurutan, didapatkan aktivitas pada pengujian LPO sebesar $58,3 \pm 3,5$ nmol MDA/g, $48 \pm 2,7$ nmol MDA/g, dan 373.8 ± 45.2 nmol g⁻¹ protein.

Tabel 7. Aktivitas Antioksidan pada Antioksidan Enzimatik

Moluska	Sumber Antioksidan	Aktivitas Antioksidan				Referensi
		SOD	CAT	GSH	LPO	
<i>Lobiger serradifalci</i> (opisthobrancia laut)	Seluruh bagian tubuh di dinginkan, kemudian sampel dihomogenisasi dengan menggunakan buffer potassium fosfat pada pH 7,4 (pH 7,0 untuk aktivitas CAT) sebanyak 11.200 gram selama 15 menit.	27 ± 2 IU/mg	217 ± 3,5 IU/mg	3,9 ± 0,3 IU/mg	58,3 ± 3,5 nmol MDA/g	(Cavas <i>et al.</i> , 2005)
<i>Oxyhoe olivacea</i> (opisthobrancia laut)	Seluruh bagian tubuh di dinginkan, kemudian sampel dihomogenisasi dengan menggunakan buffer potassium fosfat pada pH 7,4 (pH 7,0 untuk aktivitas CAT) sebanyak 11.200 gram selama 15 menit.	14 ± 1,5 IU/mg	180,2 ± 5 IU/mg	5,9 ± 0,8 IU/mg	48 ± 2,7 nmol MDA/g	(Cavas <i>et al.</i> , 2005)
<i>Ruditapes decussatus</i> (clam)	Insang yang sudah dipisahkan dari bagian tubuh lainnya disimpan dalam pendingin, kemudian dihomogenisasi menggunakan larutan tris buffer 20mM (pH 7.6) yang terdiri dari ethylene diamine 1mM, tetraacetic acid (EDTA), saccharose 0,5M, KCl 0,15 M, dan dithiothreitol 1mM. Setelah dihomogenisasi, disentrifugasi sebanyak 2 kali untuk mendapatkan fraksi mitokondira yang kemudian di purifikasi untuk menghilangkan protein yang memiliki berat molekul yang rendah.	84 ± 4	91 ± 5	0.0099 ± 0.0016 µmol min ¹ mg ¹ protein	373.8 ± 45.2 nmol g ⁻¹ protein	(Geret <i>et al.</i> , 2002)