

4 METODE ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA MOLUSKA

4.1 Analisis Aktivitas Antioksidan pada Moluska

Analisis antioksidan merupakan pengukuran secara kuantitatif terhadap kemampuan suatu komponen sebagai agen pereduksi. Analisis antioksidan sendiri dibagi menjadi 2, yaitu: HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) dan SET (*Single Electron Transfer*), meski keduanya terkadang muncul hampir selalu bersamaan, tetapi keduanya memiliki mekanisme yang berbeda. Berikut adalah perbedaan keduanya, yaitu :

a. HAT

Metode yang digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan yang digunakan dalam menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom H. Efektif digunakan untuk komponen fenolik dan dalam pengujiannya menggunakan senyawa pewarna yang merupakan suatu radikal bebas. Pada pengujian ditandai adanya aktivitas antioksidan dengan perubahan warna, dari yang berwarna menjadi tidak berwarna. Jika dibandingkan dengan metode SET, maka metode ini jauh lebih dominan. Contohnya adalah pengujian menggunakan metode ABTS dan *Hydroxyl radical scavenging assay* (ORAC_{OH*})

b. SET

Metode yang berbasis pada reaksi redoks. Antioksidan yang diuji akan bereaksi dengan agen oksidasi yang juga merupakan senyawa *fluorescence*. SET diukur dengan menggunakan spektrofotometer untuk mengukur perubahan warna yang berkorelasi dengan konsentrasi antioksidan dalam sampel. Metode ini dipengaruhi oleh pH dan solven yang digunakan. Sedangkan pengukurannya berdasarkan pada perubahan warna yang terjadi, semakin besar perubahan warna maka semakin tinggi proses reduksi. Hal ini menandakan aktivitas antioksidan yang semakin besar pula. Contohnya adalah pengujian antioksidan menggunakan FRAP dan DPPH.

(Karadag *et al.*, 2009; Youssef, 2015)

Berdasarkan kedua mekanisme analisis antioksidan tersebut, ditemukan bahwa pada moluska, jenis uji yang banyak digunakan adalah FRAP, DPPH, HORAC, dan ABTS. Maka, akan dilakukan pembahasan lebih lanjut mengenai metode analisis tersebut dan faktor yang mempengaruhi pengujian serta keuntungan dan kekurangan penggunaan analisis tersebut pada moluska.

4.1.1 Metode Analisis FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*)

FRAP merupakan metode analisis yang biasa digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru. TPTZ sendiri adalah *colorants* dan Fe(III) merupakan radikal bebas. Kekuatan antioksidan yang diuji menggunakan FRAP, tidak perlu melibatkan perlakuan *pre-treatment*, karena dianggap konstan dan linear dengan hasil pengujian. Pada pengujian FRAP, idealnya sampel yang digunakan $>3000\mu\text{M}$ dan dilarutkan pada air ataupun ethanol, dan dilakukan uji pengulangan dengan pengenceran bertahap untuk pengukuran nilai FRAP. Proses pengujian dilakukan pada pH asam dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, menggunakan *diode-array spectrophotometer* (Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014).

Metode ini sendiri dianggap dapat mengukur kombinasi efek antioksidan dari molekul biologi bukan enzim. Selain itu juga memberikan indeks kemampuan untuk mengurangi efek oksidatif dari radikal bebas. Biasanya uji digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada plasma dan fenol yang terekstraksi pada fasa aqueous atau methanol. FRAP mendeskripsikan hasil pengujian sebagai reaksi kinetik dan hubungannya dengan dosis dari larutan yang diuji, serta menunjukkan aktivitas antioksidan setara dengan yang terjadi dalam plasma tubuh (Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014).

Selain itu, sama seperti metode pengujian lain, pengujian ini menggunakan antioksidan standar yang sudah diketahui kemampuannya sebagai pembanding atau kombinasi interaksi antar keduanya. Contohnya adalah asam askorbat, *α -tocopherol*, dan bilirubin. Kelebihan dari penggunaan FRAP adalah cepat, cocok untuk sampel plasma (baik hanya dalam bentuk

satu jenis antioksidan atau ketika bercampur dengan plasma), mudah, dan reagen mudah didapat. Berhubungan dengan karakteristik dosis (*dose dependent*) dari antioksidan yang akan berbeda bergantung dari aktivitas antioksidan dan jenisnya. (Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010; Al-Dabbas *et al.*, 2007; Embuscado, 2015; Widyastuti, 2010; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006; Youssef, 2015; Benzie & Strain, 1996).

4.1.2 Metode Analisis ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

ABTS merupakan senyawa radikal kation organik yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bereaksi pada pH 7,4 berdasarkan waktu dan persentase diskolorasi sebagai bagian dari fungsi konsentrasi. Aktivitas dari ABTS ditandai dengan perubahan warna yang terjadi dari biru atau hijau, menjadi tidak berwarna. Pengukuran ABTS dilakukan, untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mendonorkan radikal proton, sehingga tercapai kestabilan. Kalorimeter digunakan untuk menghitung secara kuantitatif kemampuan antioksidan tersebut pada panjang gelombang 734nm. Sama seperti pengukuran lain, pengukuran metode ini menggunakan antioksidan pembanding sebagai kurva standar, seperti *alpha-tocopherol*, *glutathione*, dan *uric acid*. Kelebihan pada penggunaan metode ABTS atau biasa disebut sebagai TEAC dianggap sebagai metode yang mudah, cepat, dapat digunakan baik pada fasa *aqueous* ataupun *lipid* (Karadag *et al.*, 2009; Badarinath *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2015; Boligon *et al.*, 2014; Fitriana, Fatmawati, & Ersam, 2015; Torres, Santos, Chow, Pena Ferreira, & dos Santos, 2018).

4.1.3 Metode Analisis DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl)

Uji aktivitas antioksidan ini ditemukan oleh Blois (1995), dimana dalam pengujian menggunakan DPPH (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazyl; C₁₈H₁₂N₅O₆, M=394.33) yang merupakan radikal bebas yang bersifat stabil (Kedare&Sigh, 2011). Pada uji ini, DPPH akan berwarna ungu karena adanya delokalisasi, yang kemudian akan berubah warna menjadi kuning hydrazine ketika bereaksi dengan antioksidan dan mengalami proses reduksi. Proses reduksi terjadi karena adanya donor hidrogen dari substrat yang mengakibatkan warna ungu

pada DPPH berkurang (Boligon *et al.*, 2014, Mishra *et al.*, 2012; Kedare&Sigh., 2011; Van Goethem, Zurita, Martin Bermejo, Lemaî, & Bischoff, 2001).

DPPH berfungsi dalam mengevaluasi potensi antioksidan dalam meredam radikal bebas (Praditasari, 2018). Dalam proses evaluasi antioksidan menggunakan uji DPPH, terdapat proses skrining yang bertujuan sebagai uji kuantitatif aktivitas antioksidan dengan menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang maksimal yaitu 515 nm (Rahay *et al.*, 2009; Tamat *et al.*, 2007). DPPH hanya larut dalam pelarut organik seperti methanol dan etil asetat, juga digunakan untuk pengujian antioksidan yang bersifat polar (Pyrzynska & Pekal, 2013; Nurjanah, Izzati, & Abdullah, 2011). Selain itu, berdasarkan beberapa jurnal, karena sifatnya sebagai radikal bebas, uji DPPH dipengaruhi juga oleh: cahaya, pH, jenis pelarut, lama proses, ion organik, garam dan suhu (Ozcelik *et al.*, 2003; Pyrzynska & Pekal, 2013; Xie & Schaich, 2014; Mishra *et al.*, 2012; Al-Dabbas *et al.*, 2007).

Konsentrasi aktivitas antioksidan yang diuji dengan menggunakan uji DPPH dinyatakan dengan parameter IC_{50} (berasal dari *inhibition concentration* IC_{50} atau bisa dinyatakan sebagai *efficiency concentration* EC_{50}), dimana angka ini menyatakan konsentrasi antioksidan yang digunakan dalam mengurangi konsentrasi DPPH sebanyak 50%. Semakin sedikit nilainya maka menyatakan bahwa semakin besar aktivitas antioksidannya, yang kemudian dikalkulasi dengan menggunakan *inhibition curve* (Mishra *et al.*, 2012; Pyrzynska & Pekal, 2013; Yudiati, Sedjati, Surnarsih, & Agustian, 2011; Shekhar & Anju, 2014; Embuscado, 2015)

4.1.4 Metode Analisis ORAC_{OH}* atau HORAC (*Hydroxyl Radical Activities*)

Pada umumnya, ORAC menggunakan pengukuran reaksi antioksidan dengan senyawa radikal bebas AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propane), dimana antioksidan akan transfer atom hydrogen untuk mereduksi radikal bebas. Aktivitas terjadi ketika adanya substitusi OH dengan struktur antioksidan yang diteliti. Banyak digunakan untuk pengujian pada sampel yang berbentuk plasma dan serum, tetapi tidak perlu ada proses *protein removal*. Metode ini dianggap sebagai sistem yang dapat menggunakan teknik area dibawah kurva dan

mengkombinasikan hubungan antara waktu inhibisi dengan derajat inhibisi dari senyawa radikal oleh antioksidan. Dibandingkan dengan metode lain yang menggunakan waktu inhibisi pada waktu yang ditentukan sebagai hasil kuantitatif (Karadag *et al.*, 2009; Widyastuti, 2010; Youssef, 2015; Cao, Sofic, & Prior, 1997).

Prinsip dari metode ini adalah ketika radikal bebas, yaitu azo-initiator ditambahkan molekul berwarna atau *fluorescent* seperti β -phicoerythrin kemudian dipanaskan, azo-initiator akan menghasilkan radikal bebas peroksil yang merusak β -phicoerythrin sehingga kehilangan warnanya atau menjadi tidak berwarna. Kurva intensitas vs waktu yang area dibawahnya merupakan kalkulasi antara pengaruh penambahan atau tanpa penambahan antioksidan. Lalu dikomparasi dengan kurva standard menggunakan antioksidan (\pm)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, yang merupakan vitamin E analog (Karadag *et al.*, 2009; Widyastuti, 2010; Youssef, 2015; Cao *et al.*, 1997).

4.2 Proses Pengujian Aktivitas Antioksidan dan Faktor yang Mempengaruhinya

Bagaimana kedua faktor, metode preparasi dan matriks penyusun, berpengaruh pada metode pengujian yang mempengaruhi hasil aktivitas antioksidan untuk setiap metode. Pada metode FRAP, terlihat pada data tabel 3., sedikit sampel yang menggunakan pengujian FRAP. Pada sampel dengan pengujian FRAP, menunjukkan bahwa FRAP memiliki aktivitas lebih rendah dibandingkan uji lainnya. Pengujian FRAP menggunakan pH asam selama proses pengujian berlangsung.. Hal ini berpengaruh terhadap matriks penyusun antioksidan. Contohnya pada sampel biopeptida yang mengandung Tyr dan Trp sangat bergantung pada nilai pH pengujian.. Penggunaan pH rendah (pH 3,6) tidak dapat diaplikasikan beberapa jenis ikatan peptida yang mengandung asam amino tersebut. Namun, asam amino Cys-Cys diketahui tidak terpengaruh oleh pH, dan dapat menggunakan FRAP sebagai metode pengujiannya. (Widyastuti, 2010; Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010).

Selain itu, tidak semua antioksidan mampu mereduksi Fe(III) dengan waktu yang sesuai waktu inkubasi. Pada beberapa senyawa polifenol membutuhkan waktu untuk mencapai hasil

maksimal. Ketika estimasi penggunaan metode FRAP hanya 4-6 menit saja. Terlihat pada tabel , tidak terdapat penggunaan metode FRAP untuk pengujian aktivitas antioksidan. Hal ini juga terlihat pada minimnya uji FRAP yang digunakan pada sampel biopeptida, FRAP juga tidak dapat mendeteksi komponen antioksidan seperti thiol, glutathione dan protein (mengandung gugus SH) karena membutuhkan waktu reaksi yang lama. Faktor terakhir dari minimnya penggunaan metode FRAP adalah karena adanya senyawa pengganggu, banyak terdapat pada sampel biologis. Namun, FRAP memiliki beberapa kelebihan seperti cepat, mudah, tidak mahal, dan tidak membutuhkan peralatan spesifik, serta dapat dilakukan secara otomatis, semi-otomatis, atau manual (Widyastuti, 2010; Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010). Hal ini ditunjukkan pada sampel tinta *Loligo formosana*, hasil pengujian FRAP lebih sedikit dibandingkan dengan pengujian antioksidan lainnya (Zhouyong *et al.*, 2017).

Selain itu, tidak terdapat hubungan antara angka FRAP dengan jumlah elektron yang didonorkan oleh antioksidan, karena donor elektron dari substansi bukan antioksidan dapat berkontribusi dalam angka FRAP. Hal ini disebabkan karena nilai potensial reduksi standar dari Fe (III)/Fe(II) adalah 0.77 V sehingga senyawa apapun dengan nilai potensial reduksi dibawah 0.77 V dapat mereduksi Fe(III) menjadi Fe(II) dan memberikan kontribusi pada pengukuran antioksidan dengan metode FRAP (Widyastuti, 2010; Zou *et al.*, 2016; Karadag *et al.*, 2009; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Badarinath *et al.*, 2010). Hal ini ditunjukkan pada sampel pepsin hydrosilates *Sephia pharaonic* dan biopeptida *Lamellibranchia*, pada pengujian FRAP hasil yang didapatkan lebih lebih tinggi dari uji DPPH dan HO *scavenging*. (Siahpoosh & Alikhani, 2016; Vate & Benjakul, 2013). Hal ini dapat disebabkan karena adanya senyawa bukan antioksidan dan adanya modifikasi metode yang memberikan nilai tambah pada aktivitas antioksidan. .

Penggunaan ABTS diketahui dapat digunakan untuk fase hidrofilik ataupun hidrofobik. Sehingga dapat digunakan pada berbagai jenis matriks penyusun seperti pada biopeptida dan polisakarida. Namun, ketika jumlah molekul hidrofobik berlebih aktivitas ABTS akan jauh

lebih rendah jika dibandingkan dengan pengujian HO^- scavenging yang lebih sensitif (Zou *et al.*, 2016).

Pada sampel hidrosilat pepsin *Sepia pharaonic* dan chitosan pada Chiton, hasil pengujian ABTS lebih rendah nilai IC50 dibandingkan dengan pengujian lain (Siahpoosh & Alikhani, 2016; Rasti *et al.*, 2017). Hal ini disebabkan karena ABTS memiliki batas waktu pengujian seperti FRAP, sehingga bisa saja aktivitas antioksidan pada sampel terjadi setelah batas waktu pengujian. Sehingga hasil aktivitas antioksidan tidak mencapai titik maksimum. Hal ini berlaku pada sampel berasal dari senyawa fenolik ataupun produk alami yang membutuhkan waktu lebih lama untuk mencapai titik akhir. Sehingga pembacaan aktivitas antioksidan tidak maksimal dan nilai IC50 tidak mencapai dibawah 50 ataupun persentase aktivitas lebih rendah dibandingkan pengujian lainnya (Karadag *et al.*, 2009; Badarinath *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2015).

ABTS merupakan pengujian untuk mengetahui proses scavenging pada radikal bebas ABTS dan tidak menggambarkan proses serupa pada proses oksidatif dalam tubuh. Hal ini disebabkan karena radikal ABTS tidak ditemukan dalam tubuh, sehingga tidak dapat menggambarkan proses aktivitas antioksidan secara *in vitro*. Berdasarkan hal tersebut, menunjukkan bahwa ABTS tidak menjadi pilihan untuk pengujian aktivitas antioksidan. Meski begitu, ABTS memiliki beberapa kelebihan seperti proses pengujian pada pH netral dengan rentang yang cukup panjang, sehingga dapat diaplikasikan pada berbagai jenis antioksidan (Boligon *et al.*, 2014; Fitriana, Fatmawati, & Ersam, 2015).

Pada uji HO^- scavenging, banyak digunakan pada sampel biopeptida, juga digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan pada *hyaluronic acid Amassium pleuronectus* serta memberikan hasil yang signifikan (Kanchana *et al.*, 2013). Pada sampel biopeptida semakin panjang rantai akan memiliki kelarutan yang lebih tinggi pada proses pengujian, hal ini akan meningkatkan aktivitas HO^- scavenging. Meski begitu, molekul dengan berat molekul yang lebih rendah tetap memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Berbanding terbalik dengan ABTS, semakin banyak asam amino bersifat hidrofobik pada ikatan peptida akan

meningkatkan aktivitas antioksidan pada pengujian. Selain pengujian pada sampel hidrofobik, pada sampel hidrofilik HO^\cdot scavenging dapat memberikan hasil pengukuran secara langsung saat antioksidan pada sampel merusak rantai radikal hidroksil.

HO^\cdot merupakan radikal reaktif dan biasa ditemukan dalam tubuh. HO^\cdot scavenging atau biasa dikenal sebagai HORAC, merupakan metode terbaru yang banyak digunakan dalam proses uji aktivitas antioksidan. Metode ini memiliki tingkat sensitivitas yang tinggi, sehingga mampu menghasilkan nilai aktivitas antioksidan yang lebih baik. Namun, metode pengujian ini membutuhkan biaya yang cukup mahal dan peralatan khusus (Youssef, 2015; Zou *et al.*, 2016; MacDonald-Wicks *et al.*, 2006).

Pengujian selanjutnya adalah uji DPPH. Hampir pada setiap sampel moluska menggunakan uji DPPH. Hasil pengujian memiliki aktivitas antioksidan yang cukup signifikan. DPPH sendiri hanya larut dalam pelarut organik seperti metanol dan etil asetat, juga digunakan untuk pengujian antioksidan yang bersifat polar, hal ini sesuai digunakan untuk pengujian sampel yang bersifat polar (Pyrzynska & Pekal, 2013; Nurjanah, Izzati, & Abdullah, 2011). Penggunaan metode DPPH hampir selalu digunakan pada semua sampel. Contohnya terdapat pada sampel *hyaluronic acid Amassium pleuronectus* (Kanchana *et al.*, 2013).

Metode pengujian yang bersifat cepat, mudah, reversibel dan hanya membutuhkan spektrofotometer sebagai alasan banyaknya penggunaan DPPH untuk pengujian. Namun, terdapat beberapa kelemahan pada metode pengujian DPPH yaitu: peka terhadap cahaya, mudah terkoagulasi, pada beberapa jenis antioksidan reaksi berjalan lambat, tidak cocok untuk uji aktivitas antioksidan dalam plasma. Hal ini yang menyebabkan beberapa hasil pengujian DPPH tidak lebih tinggi, jika dibandingkan dengan pengujian aktivitas antioksidan pada HO^\cdot radical scavenging (Kedare & Singh, 2011; Lopez-Alarcon & Denicola, 2012; Mishra *et al.*, 2012; Boligon *et al.*, 2014; Karadag *et al.*, 2009; Fitriana *et al.*, 2015).