

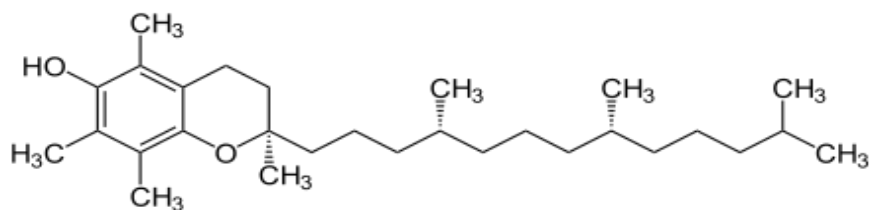
# 1. PENDAHULUAN

## 1.1. Latar Belakang

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah terjadinya proses reaksi pembentukan radikal bebas dalam oksidasi lipid (Ahmad *et al.*, 2012). Sedangkan, radikal bebas adalah gugus atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga bersifat reaktif. Terakumulasinya radikal bebas di dalam tubuh dapat menonaktifkan aktivitas enzim sehingga lemak dalam tubuh akan teroksidasi dan mengganggu DNA yang dapat memicu terjadinya mutasi sel-sel yang berdampak pada risiko munculnya kanker (Astuti dan Syamhudi, 2014).

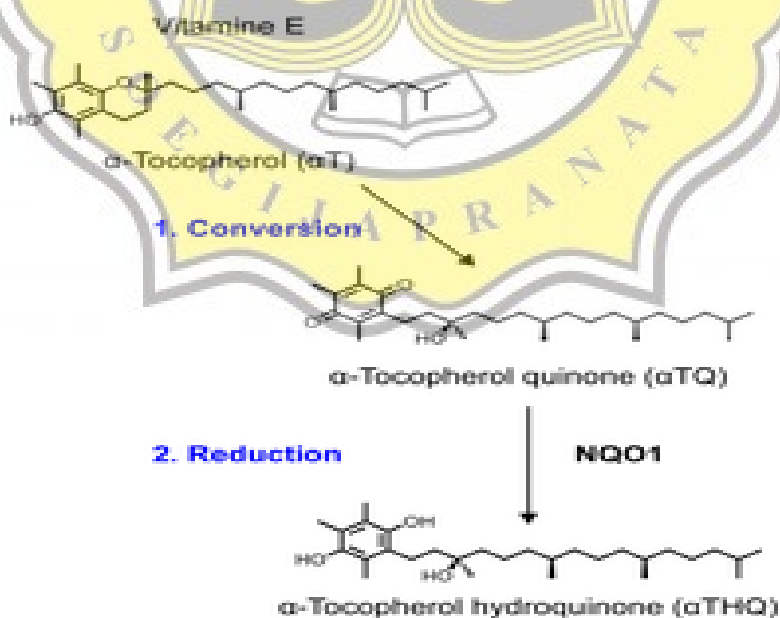
Masyarakat yang mulai sadar akan gaya hidup sehat mulai mengonsumsi makanan-makanan yang diyakini mengandung antioksidan alami seperti sayur dan buah. Namun, tidak jarang pula masyarakat mengonsumsi vitamin-*vitamin* tertentu dalam bentuk kapsul ataupun pil berisi antioksidan untuk menjaga kesehatan tubuhnya. Menurut Halliwell (1996) antioksidan alami dalam buah-buahan dan sayuran terbagi menjadi tiga kelompok utama yaitu vitamin, fenolik, dan karotenoid. Asam askorbat dan fenolik dikenal sebagai antioksidan hidrofilik, sedangkan karotenoid dikenal sebagai antioksidan lipofilik. Aktivitas antioksidan sebagai penangkal radikal bebas dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya pelarut, cara ekstraksi, tekanan oksigen, kandungan lipid, serta pemanasan (Wanti, 2008; Sayuti dan Yenrina, 2015).

Vitamin E merupakan salah satu antioksidan yang bersifat mudah teroksidasi sehingga dapat melindungi senyawa lain dan struktur membran lipid, serta memiliki kemampuan untuk mematikan zat radikal bebas (Burton, 1990). Kebutuhan akan konsumsi vitamin E dapat diperoleh dari biji bunga matahari dan minyak jagung serta kedelai. Kolostrum dari manusia dan sapi mengandung vitamin E sepuluh kali lipat lebih tinggi dibandingkan susunya. Minyak jagung, minyak kapas dan minyak gandum mengandung vitamin E sekitar 0,01-0,05% (Lamid, 1995).



Gambar 1. Struktur Alami Tokoferol  
(Sumber : Fryer, 1992)

Sebagai senyawa antioksidan, vitamin E bertindak sebagai pendonor atom hidrogen pada radikal bebas sehingga terbentuk radikal yang lebih stabil. Vitamin E mendonorkan atom hidrogennya dengan cara mengoksidasi  $\alpha$ -tocopherol menjadi bentuk  $\alpha$ -tocopherolquinone, kemudian  $\alpha$ -Tocopherolquinone tereduksi menjadi  $\alpha$ -tocopherylhydroquinone. Bentuk  $\alpha$ -tocopherylhydroquinone inilah yang bertindak sebagai antioksidan kuat yang menangkal radikal bebas dengan menyumbangkan atom hidrogennya.  $\alpha$ -tocopherylhydroquinone dapat kembali menjadi *tocopherol* dengan mereduksi radikal *tocopheroxyl* (Pekiner, 2003; Niki, 2007). Hal tersebut diperkuat oleh Fryer (1992) yang menyatakan bahwa  $\alpha$ -tocopherol dapat bertindak sebagai antioksidan pemecah rantai dalam oksidasi lipid yang dipicu oleh polutan dan dapat di regenerasi dengan baik.



Gambar 2. Mekanisme Vitamin E dalam Mendonorkan Hidrogen

Sumber : (Hinman *et al.*, 2018)

NaCl atau yang biasa dikenal sebagai garam dapur oleh untuk warga Indonesia merupakan barang yang sudah tidak asing lagi, karena seringkali dimanfaatkan sebagai bumbu dapur serta pengawet alami. Data statistik menunjukkan bahwa tahun 2010, tingkat konsumsi natrium global mencapai 3,9 gram/hari atau setara dengan 10 gram/orang/hari. Tingkat konsumsi tersebut melebihi asupan maksimum natrium yang ditetapkan oleh Kementerian Kesehatan yaitu 2 gram/hari atau jika disetarakan sama dengan 5 gram/orang/hari. Sedangkan Badan Kesehatan Dunia atau WHO (*World Health Organization*) menetapkan batas konsumsi natrium 2,4 gr/hari (Powles *et al.*, 2013). Salah satu produk olahan makanan yang mengandung cukup banyak garam adalah produk asinan. Larutan garam pada asinan berfungsi untuk mengeluarkan cairan dalam bahan yang banyak mengandung gula dan protein karena terjadinya proses osmosis yang dimanfaatkan sebagai media pertumbuhan bakteri, penambahan garam juga dapat berperan sebagai penghambat pertumbuhan mikroba pembusuk maupun patogen sebab tingginya konsentrasi garam akan mengurangi pH pada produk fermentasi sehingga menciptakan suasana yang asam (Yusmarini *et al.*, 2019; Kaur *et al.*, 2018).

Keberadaan garam ternyata dapat berpengaruh terhadap senyawa antioksidan, menurut Ahn *et al* (1993) penambahan NaCl di dalam sistem pangan dapat meningkatkan kesempatan terjadinya peroksidasi lipid, sebab NaCl tersebut dapat menggantikan ion besi dari makromolekul pengikat. Andersen dan Skibsted (1991). Mabrouk dan Dugan (1960) menyatakan bahwa NaCl memberikan efek prooksidan yang kuat. Kanner *et al.* (1988) menambahkan bahwa secara keseluruhan NaCl dapat menjadi prooksidan jika ditambahkan pada konsentrasi 0,1 M sampai 1,0 M.

Pengukuran antioksidan banyak dilakukan untuk mengetahui kadar antioksidan atau untuk menentukan seberapa besar aktivitas antioksidan di dalam bahan. Berdasarkan cara kerjanya, metode antioksidan dibagi menjadi beberapa golongan yaitu *single electron transfer* (SET), *hydrogen atom transfer* (HAT), *chelating* logam transisi. *Single electron transfer* (SET) dan *hydrogen atom transfer* (HAT) keduanya sama-sama mengukur kemampuan *radical scavenging*.

*Single electron transfer* (SET) mengukur kemampuan pengurangan antioksidan, sedangkan *hydrogen atom transfer* (HAT) mengukur kemampuan donasi atom hidrogen (Apak *et al.*, 2004). Golongan ketiga yaitu kemampuan untuk mengkelat logam transisi seperti  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , dan  $Cu^{2+}$ , yang dapat digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dari suatu senyawa atau ekstrak (Santos *et al.*, 2017).

Mekanisme metode DPPH adalah menetralkan komponen radikal dengan menerima atom hidrogen dari komponen antioksidan. Tipe pelarut yang umumnya digunakan dalam metode DPPH adalah etanol dan metanol, panjang gelombang yang digunakan juga bervariasi, yakni berkisar 515 nm sampai dengan 520 nm. Elektron radikal DPPH yang tidak berpasangan yang membentuk warna ungu gelap akan menyerap kuat absorbansi pada panjang gelombang 517 nm (Zhang *et al.*, 2019; Di *et al.*, 2003; Jack dan Rohman, 2005). Saat elektron telah berpasangan akan mengubah warna menjadi kekuningan. Kelebihan dari metode ini adalah pengerjaannya yang sederhana, ekonomis, cepat, dapat mengukur antioksidan pada sistem biologis kompleks, dengan waktu inkubasi 30 menit DPPH dapat bereaksi secara efisien meskipun pada antioksidan yang rendah, sensitifitasnya tinggi. Namun, kekurangan pada metode ini diantaranya DPPH hanya dapat larut pada pelarut organik, DPPH cenderung bereaksi dengan radikal lain yang terdapat di sampel, sensitif terhadap cahaya sehingga pengujian dilakukan di tempat gelap (Kedare dan Singh, 2011; Bondet *et al.*, 1997; Schaich *et al.*, 2015; Ancerewicz *et al.*, 1998; Bibi *et al.*, 2020).

Metode FRAP pada prinsipnya yaitu mereduksi ferric-tripyridyltriazine ( $Fe(III)TPTZ$ )<sup>3+</sup> dengan membentuk warna biru dari pembentukan ( $Fe(II)TPTZ$ )<sup>3+</sup> dibawah kondisi asam dengan pH 3.6 yang bertujuan untuk menjaga kelarutan ion besi sehingga dapat menurunkan kemampuan ionisasi dan meningkatkan potensi reaksi oksidasi, lalu dengan waktu inkubasi 30 menit dan panjang gelombang pengujian 593 nm. Kekurangan metode ini adalah pengujiannya yang terbilang tidak spesifik sebab jika ada komponen di dalam reaksi tersebut memiliki potensi redoks yang lebih rendah dibandingkan dengan  $Fe(III)$ , maka komponen tersebut dapat berperan untuk mereduksi ( $Fe(III)TPTZ$ )<sup>3+</sup>. Sedangkan, kelebihan dari metode FRAP pengerjaannya yang sederhana dan tidak begitu mahal, sensitif, spektrum

pengujiannya luas dimana dapat menguji sampel berupa darah, serum, saliva, urin, ekstrak organik dan aquos dari obat-obatan, makanan dan tanaman. Akan lebih baik ketika menyiapkan reagen FRAP harus diperhatikan urutannya, larutan buffer asetat ditambahkan pertama, kemudian  $\text{FeCl}_3$ , dan TPTZ ditambahkan terakhir untuk mencegah terjadinya reduksi  $\text{FeCl}_3$  oleh TPTZ. Aktivitas antioksidan dengan metode FRAP dapat ditampilkan dengan parameter Trolox equivalent, *gallic acid*, *ascorbic acid*, quercetin atau  $\alpha$ -tocopherol (Benzie dan Strain, 1996; Berker *et al.*, 2007; Benzie dan Strain, 1999; Choirunnisa, 2016, Bibi *et al.*, 2020).

Metode reaksi Fosfomolibdate berdasarkan terjadinya reduksi molibdenum (VI) menjadi molibdenum (V) dengan waktu inkubasi 90 menit pada suhu  $95^\circ \text{C}$  yang kemudian membentuk warna biru kehijauan yang diukur dengan panjang gelombang 695 nm. Warna biru kehijauan merupakan hasil reduksi amonium molibdat yang dikenal dengan ion Keggin  $[\text{H}_3\text{PO}_4 (\text{MoO}_3)_{12}]$  pada kondisi asam dan dengan adanya antioksidan menjadi  $[\text{H}_4\text{PMo}_8^{\text{VI}}\text{Mo}_4^{\text{V}}\text{O}_{40}]^{3-}$ . Kelebihan metode ini yaitu pembentukan kompleks fosfomolibdenum yang tidak bergantung pada pelarut organik berbeda (seperti metanol, etanol, heksana dan dimetil sulfoksida) yang digunakan untuk persiapan antioksidan atau larutan stok, pengerjaannya sederhana, sensitif dan reagenya murah. Metode ini juga dapat menguji spektrum sampel yang luas, baik dari ekstrak tumbuhan lipofilik, minyak nabati, mentega, serum, obat-obatan. Kelemahan dari metode ini yaitu korelasi buruk terhadap komponen bioaktif (fenolik dan flavonoid), waktu dan suhu inkubasi yang dibutuhkan tidak efisien untuk sampel pengujian jumlah besar dan hasil uji tidak spesifik. Metode Phosphomolybdate cenderung mendeteksi antioksidan secara umum seperti karoten, asam askorbat,  $\alpha$ -tocopherol dan beberapa fenolik (Choirunnisa, 2016; Prierto *et al.*, 1999; Grigore *et al.*, 2010; Bibi *et al.*, 2020).

Penelitian *review* ini penting dilakukan karena untuk mengetahui keragaman pengukuran aktivitas antioksidan yang digunakan khususnya pada senyawa antioksidan lipofilik vitamin E serta pengaruh dari keberadaan NaCl terhadap hasil uji antioksidan. Berdasarkan beberapa pustaka yang ada, diketahui bahwa telah banyak metode pengukuran aktivitas antioksidan yang digunakan untuk mengukur senyawa antioksidan vitamin E. Namun, belum ada

penelitian yang membandingkan keragaman metode pengukuran antioksidan vitamin E serta menjelaskan pengaruh NaCl khususnya dalam bahan pangan terhadap senyawa antioksidannya yang diukur menggunakan tiga metode pengujian yaitu metode DPPH, FRAP dan Fosfomolybdate. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan pengetahuan lebih dan dapat membantu pihak atau para peneliti yang melakukan penelitian pengukuran aktivitas antioksidan pada vitamin E serta dapat membantu peneliti untuk memilih metode yang tepat pada sampel yang mengandung garam.

### **1.2. Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman pengukuran aktivitas antioksidan pada senyawa antioksidan vitamin E, serta pengaruh garam terhadap antioksidan yang diuji dengan menggunakan tiga macam metode pengujian antioksidan yaitu metode DPPH, FRAP, dan Fosfomolybdate.

