

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT**

Jl. Pawiyatan Luhur IV/1 Bendan Duwur Semarang 50234  
Telp. (024) 8441555,8505003 (ext.1461,1462), Fax.(024) 8445265  
e-mail: lppm@unika.ac.id, lppm.unikasmg@gmail.com  
http://www.unika.ac.id



## SURAT TUGAS

Nomor : 00750/H.2/ST.LPPM/VII/2020

Kepala Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Katolik Soegijapranata Semarang dengan ini memberi tugas kepada :

- Nama : Dr. Ir. B. Soedarini, MP (Ketua)  
Dr. R Probo Yulianto Nugrahedi, S.TP., M.Sc. (Anggota)
- Status : Dosen Tetap Universitas Katolik Soegijapranata Semarang
- Tugas : Penelitian Ristek Dikti tahun anggaran 2020 Skim Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi dengan judul "**Mekanisme ionic bounding Na<sup>+</sup> dan pengaruhnya terhadap Sensitivitas Deteksi Aktivitas Antioksidan Metode DPPH**"
- Waktu : 12 Maret – 22 Desember 2020
- Penyelenggara : Ristek-Dikti
- Lain-lain : Harap melaksanakan tugas dengan sebaik-baiknya dan penuh tanggung jawab serta memberikan laporan setelah selesai melaksanakan tugas.

Demikian surat tugas ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.



Semarang, 3 Juli 2020  
Kepala LPPM

Dr. Berta Berti Retnawati, MSi  
NPP.058.1. 1998.219

### PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

## LAPORAN AKHIR PENELITIAN MULTI TAHUN

ID Proposal: 3fbf2190-5225-4e75-9da1-e8c38e13c887  
Laporan Akhir Penelitian: tahun ke-2 dari 2 tahun

### 1. IDENTITAS PENELITIAN

#### A. JUDUL PENELITIAN

Mekanisme ionic bonding Na<sup>+</sup> dan pengaruhnya terhadap sensitivitas deteksi aktivitas antioksidan metode DPPH.

#### B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

| Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi | Tema | Topik (jika ada)  | Rumpun Bidang Ilmu |
|--|------|---|--------------------|
| Ketahanan Pangan                                     | -    | Peningkatan nilai tambah produk dan ketahanan pangan yang berbasis sumberdaya pertanian lokal | Ilmu Pangan        |

#### C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

| Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan) | Skema Penelitian                           | Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan) | SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan) | Target Akhir TKT | Lama Penelitian (Tahun) |
|---|--|---------------------------------------|------------------------------------|------------------|-------------------------|
| Penelitian Desentralisasi                                 | Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi | SBK Riset Dasar                       | SBK Riset Dasar                    | 2                | 2                       |

### 2. IDENTITAS PENGUSUL

| Nama, Peran   | Perguruan Tinggi/ Institusi        | Program Studi/ Bagian | Bidang Tugas | ID Sinta | H-Index |
|---|------------------------------------|-----------------------|--------------|----------|---------|
| SOEDARINI<br>Ketua Pengusul                                     | Universitas Katolik Soegijapranata | Teknologi Pangan      |              | 6004369  | 2       |
| Dr R PROBO YULIANTO NUGRAHEDI S.TP, M.Sc.<br>Anggota Pengusul 1 | Universitas Katolik Soegijapranata | Teknologi Pangan      |              | 6012015  | 2       |

### 3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

|       |            |
|-------|------------|
| Mitra | Nama Mitra |
|-------|------------|

#### 4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

##### Luaran Wajib

| Tahun Luaran | Jenis Luaran                          | Status target capaian ( <i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i> ) | Keterangan ( <i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i> ) |
|--------------|---------------------------------------|---|--|
| 2            | Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional | accepted/published  | LWT Food Science and Technology (ISSN 0023-6438)   |

##### Luaran Tambahan

| Tahun Luaran | Jenis Luaran                                   | Status target capaian ( <i>accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya</i> ) | Keterangan ( <i>url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya</i> ) |
|--------------|--|---|--|
| 2            | Prosiding dalam pertemuan ilmiah Internasional | sudah terbit/sudah dilaksanakan   | 4th ICSAF in Taipei, Taiwan  |
| 2            | Hak Cipta                                      | granted   | Hak Cipta atas artikel journal di LWT  |

#### 5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Edisi 12.

**Total RAB 2 Tahun Rp. 74,225,000**

**Tahun 1 Total Rp. 0**

**Tahun 2 Total Rp. 74,225,000**

| Jenis Pembelanjaan                           | Item                                      | Satuan         | Vol. | Biaya Satuan | Total      |
|--|---|----------------|------|--------------|------------|
| Analisis Data                                | HR Pengolah Data                          | P (penelitian) | 1    | 1,540,000    | 1,540,000  |
| Analisis Data                                | Honorarium narasumber                     | OJ             | 9    | 900,000      | 8,100,000  |
| Analisis Data                                | Biaya analisis sampel                     | Unit           | 60   | 125,000      | 7,500,000  |
| Bahan  | ATK                                       | Paket          | 1    | 1,500,000    | 1,500,000  |
| Bahan  | Bahan Penelitian (Habis Pakai)            | Unit           | 1    | 6,325,000    | 6,325,000  |
| Bahan  | Barang Persediaan                         | Unit           | 1    | 18,660,000   | 18,660,000 |
| Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan | Biaya seminar internasional               | Paket          | 1    | 21,200,000   | 21,200,000 |
| Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan | Publikasi artikel di Jurnal Internasional | Paket          | 1    | 5,000,000    | 5,000,000  |
| Pelaporan, Luaran Wajib, dan Luaran Tambahan | Luaran KI (paten, hak cipta dll)          | Paket          | 1    | 2,000,000    | 2,000,000  |
| Pelaporan, Luaran Wajib,                     | Biaya penyusunan buku                     | Paket          | 1    | 1,500,000    | 1,500,000  |

| Jenis Pembelanjaan  | Item                       | Satuan | Vol. | Biaya Satuan | Total   |
|---------------------|----------------------------|--------|------|--------------|---------|
| dan Luaran Tambahan | termasuk book chapter      |        |      |              |         |
| Sewa Peralatan      | Ruang penunjang penelitian | Unit   | 3    | 300,000      | 900,000 |

## 6. HASIL PENELITIAN

**A. RINGKASAN:** Tuliskan secara ringkas latar belakang penelitian, tujuan dan tahapan metode penelitian, luaran yang ditargetkan, serta uraian TKT penelitian.

Antioksidan, merupakan substansi yang berperan penting dalam pencegahan penyakit-penyakit degeneratif. Penentuan aktivitas antioksidan suatu bahan pangan yang paling umum dilakukan adalah metode DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) yang berbasis spektrofotometer. Keunggulan metode DPPH adalah biayanya yang relatif murah, waktu peneraan relatif singkat, teknis pelaksanaan di laboratorium cukup mudah serta tidak menggunakan bahan kimia yang berdampak pada pencemaran lingkungan. Namun demikian, sensitivitas dan validitas deteksi metode DPPH seringkali terpengaruh oleh kondisi sampel, khususnya sinar matahari, panas dan keberadaan ion logam. Perubahan sensitivitas deteksi (bias) aktivitas antioksidan ini merugikan dari aspek reliability (tingkat kepercayaan hasil analisis) dan lebih lanjut juga pada validitas labeling komposisi pangan. Penelitian fundamental dwi-tahun dengan TKT 2 ini berfokus pada keberadaan garam NaCl terhadap validitas deteksi antioksidan yang diukur dengan metode DPPH. Hal tersebut mempertimbangkan bahwa garam (NaCl) digunakan dalam hampir semua produk olahan pangan, dan fakta bahwa ion Na<sup>+</sup> memiliki reaktivitas tertinggi diantara kelompok logam ataupun mineral lainnya. Penelitian tahun pertama (2019) dilakukan menggunakan dua jenis senyawa antioksidan murni yaitu asam askorbat pro analysis dan tokopherol pro analysis. Hasil penelitian menunjukkan, keberadaan NaCl mulai konsentrasi 5 hingga 60 mgL<sup>-1</sup> memberikan bias positif (meningkatkan) aktivitas antioksidan sampel asam askorbat (vitamin C) murni serta tokopherol (vitamin E) murni. Penelitian tahun kedua (2020) difokuskan pada sampel bahan pangan yang diketahui memiliki antioksidan tinggi, yaitu brokoli dan wortel. Perlakuan yang diberikan berupa perebusan selama 5 menit dalam larutan garam NaCl dengan konsentrasi 0; 1; 2,5; dan 5% (b/b). Hasil yang diperoleh konsisten dengan temuan tahun pertama, yaitu semakin tinggi konsentrasi garam dalam kedua jenis sampel akan memberikan peneraan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pula. Ketika peneraan DPPH dikonfirmasi dengan dua metode analisis untuk peneraan total antioksidan (FRAP dan Molybdenum) menunjukkan hasil yang konsisten juga. Kesimpulannya, Ion Na<sup>+</sup> yang terkandung dalam larutan garam mampu diserap oleh bahan pangan dan bersifat reaktif terhadap radikal bebas sehingga ketika dianalisis dengan metode DPPH, FRAP maupun Molybdenum terdeteksi sebagai antioksidan (bias positif) seperti halnya logam Selenium.

**B. KATA KUNCI:** Tuliskan maksimal 5 kata kunci.

DPPH; NaCl; Antioksidan; FRAP; Brokoli

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan seringkasan mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

**C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai

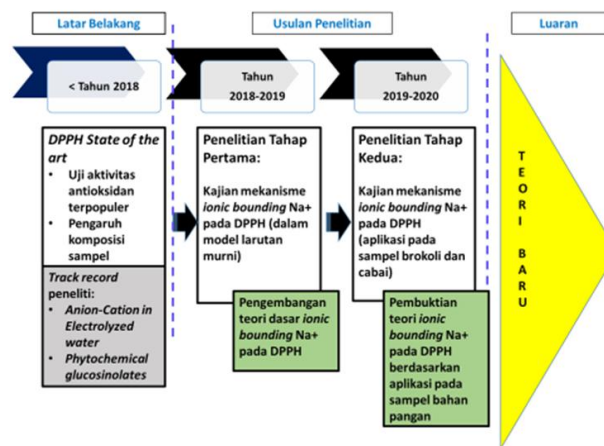
sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian dapat berupa data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.



Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

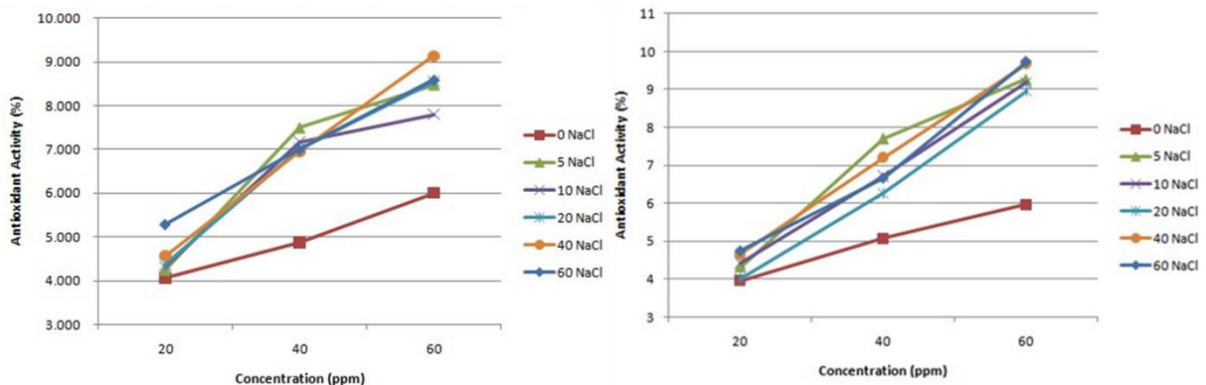
**C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Penelitian fundamental dwi tahun ini berfokus pada pengkajian keberadaan NaCl terhadap ketepatan analisis aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Keunggulan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH bersifat sederhana, cepat (Huang, 2005) dan dapat diaplikasikan secara luas (Marinova, 2011 dan Pisoschi and Negulescu, 2011).



Gambar 1. Rancangan pelaksanaan penelitian Fundamental dwi-tahun

Pada tahun pertama, penelaahan uji antioksidan metode DPPH dilakukan dengan dua jenis antioksidan murni. Asam askorbat pro analysis dipilih untuk mewakili kelompok antioksidan yang bersifat larut air (polar) dan Tokopherol pro analysis dipilih untuk mewakili kelompok antioksidan yang bersifat larut lemak (non polar). Hasil penelitian menunjukkan keberadaan NaCl mulai konsentrasi 5 hingga 60 mgL<sup>-1</sup> pada 3 tingkat larutan asam askorbat serta tokopherol masing-masing pada (20, 40 dan 60) mgL<sup>-1</sup> mempengaruhi hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode DPPH. Seperti yang tercantum dalam Gambar 1, keberadaan ion Na<sup>+</sup> memberikan bias pengukuran yaitu meningkatkan angka aktivitas antioksidan (bias positif).



Gambar 1. Grafik pengaruh ion Na<sup>+</sup> (dari garam NaCl) terhadap aktivitas antioksidan metode DPPH pada sampel asam askorbat murni mewakili antioksidan polar (a) dan sampel tokopherol murni mewakili antioksidan non polar (b)

Penelitian tahun kedua (2020) berfokus pada pengkajian keberadaan NaCl pada sampel bahan pangan terhadap ketepatan analisis (validitas) aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Sampel bahan pangan yang dipilih merupakan dua jenis sayuran yang diketahui memiliki kandungan antioksidan tinggi, yaitu brokoli dan wortel. Perlakuan yang diberikan berupa perebusan selama 5 menit dalam larutan garam NaCl dengan empat tingkat konsentrasi yaitu 0; 1; 2,5; dan 5% (b/b).

Hasil yang diperoleh pada penelitian tahun kedua tersaji pada Tabel 1 (sampel brokoli) dan Tabel 2 (sampel wortel). Jika data tersebut diamati secara mendetail, nampak adanya konsistensi dengan temuan tahun pertama, yaitu semakin tinggi konsentrasi garam dalam sampel akan memberikan peneraan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pula (bias positif). Ketika peneraan DPPH dikonfirmasi dengan dua metode analisis lain, yaitu analisis untuk penentuan total antioksidan (metode FRAP dan metode Molybdenum) ternyata menunjukkan hasil yang konsisten juga.

Tabel 1. Pengaruh NaCl terhadap aktivitas antioksidan dan total antioksidan sampel brokoli.

| No | Sampel  | Kode  | Air<br>% | pH   | NaCl        | Vitamin C | Aktivitas Antioksidan | Vit E  | Total Antioksidan Molibdate | Total antioksidan FRAP |
|----|---------|-------|----------|------|-------------|-----------|-----------------------|--------|-----------------------------|------------------------|
|    |         |       |          |      | mg/100 gram | ppm       | % discoloration       | ppm    | mg/100 gram                 | ng/100 gram            |
| 1  | Brokoli | Segar | 88,653   | 5,85 | -           | 1158,529  | 13,598                | 72,867 | 50,333                      | 440,767                |
| 2  | Brokoli | Segar | 87,706   | 5,79 | -           | 1147,551  | 13,915                | 73,433 | 44,000                      | 436,233                |
| 3  | Brokoli | Segar | 90,007   | 5,74 | -           | 1171,761  | 14,441                | 74,433 | 44,000                      | 436,067                |
| 4  | Brokoli | Blank | 91,750   | 6,23 | -           | 727,664   | 9,180                 | 41,067 | 42,333                      | 282,833                |
| 5  | Brokoli | Blank | 91,586   | 6,21 | -           | 750,890   | 9,062                 | 40,767 | 39,667                      | 293,433                |
| 6  | Brokoli | Blank | 91,815   | 6,25 | -           | 726,201   | 8,980                 | 40,667 | 40,667                      | 282,767                |
| 7  | Brokoli | 1%    | 91,315   | 6,32 | 45,55       | 741,639   | 13,960                | 18,700 | 48,667                      | 387,900                |
| 8  | Brokoli | 1%    | 91,025   | 6,25 | 57,23       | 755,315   | 14,097                | 17,233 | 43,000                      | 362,300                |
| 9  | Brokoli | 1%    | 91,277   | 6,25 | 57,23       | 781,279   | 12,355                | 18,267 | 40,333                      | 366,533                |
| 10 | Brokoli | 2,50% | 88,693   | 6,27 | 158,85      | 902,860   | 16,582                | 21,600 | 64,667                      | 465,800                |
| 11 | Brokoli | 2,50% | 88,693   | 6,20 | 160,02      | 915,054   | 16,664                | 21,567 | 53,333                      | 467,167                |
| 12 | Brokoli | 2,50% | 89,331   | 6,18 | 156,51      | 882,508   | 15,620                | 22,800 | 49,000                      | 473,400                |
| 13 | Brokoli | 5%    | 86,365   | 6,16 | 323,54      | 685,987   | 18,986                | 23,967 | 82,667                      | 550,133                |
| 14 | Brokoli | 5%    | 85,599   | 6,04 | 329,38      | 663,353   | 18,931                | 22,033 | 69,667                      | 549,467                |
| 15 | Brokoli | 5%    | 86,362   | 6,02 | 322,37      | 672,427   | 19,394                | 23,000 | 66,667                      | 549,900                |

Tabel 2. Pengaruh NaCl terhadap aktivitas antioksidan dan total antioksidan sampel wortel.

| No | Sampel | Kode  | Air<br>% | pH   | NaCl        | Vitamin C | Aktivitas Antioksidan | Vit E  | Total Antioksidan Molibdate | Total antioksidan FRAP |
|----|--------|-------|----------|------|-------------|-----------|-----------------------|--------|-----------------------------|------------------------|
|    |        |       |          |      | mg/100 gram | ppm       | % discoloration       | ppm    | mg/100 gram                 | ng/100 gram            |
| 1  | Wortel | Segar | 88,774   | 5,53 | -           | 462,721   | 6,871                 | 35,600 | 26,000                      | 132,917                |
| 2  | Wortel | Segar | 89,974   | 5,49 | -           | 442,886   | 6,852                 | 34,467 | 21,667                      | 133,950                |
| 3  | Wortel | Segar | 89,325   | 5,33 | -           | 463,892   | 6,397                 | 33,900 | 23,000                      | 134,600                |
| 4  | Wortel | Blank | 92,934   | 5,99 | -           | 400,066   | 5,011                 | 32,900 | 19,000                      | 75,933                 |
| 5  | Wortel | Blank | 92,796   | 6,02 | -           | 391,955   | 4,671                 | 32,633 | 14,333                      | 80,817                 |
| 6  | Wortel | Blank | 93,910   | 5,87 | -           | 371,019   | 4,100                 | 33,933 | 21,333                      | 82,417                 |
| 7  | Wortel | 1%    | 93,107   | 5,86 | 52,56       | 368,044   | 6,135                 | 9,133  | 18,667                      | 74,483                 |
| 8  | Wortel | 1%    | 90,555   | 5,85 | 49,06       | 369,412   | 6,106                 | 8,533  | 22,000                      | 82,117                 |
| 9  | Wortel | 1%    | 93,391   | 5,85 | 59,57       | 355,606   | 5,728                 | 11,533 | 16,000                      | 82,183                 |
| 10 | Wortel | 2,50% | 89,521   | 5,82 | 80,59       | 391,891   | 6,687                 | 11,200 | 20,000                      | 81,383                 |
| 11 | Wortel | 2,50% | 91,480   | 5,82 | 75,92       | 413,364   | 6,881                 | 11,533 | 19,333                      | 80,333                 |
| 12 | Wortel | 2,50% | 90,470   | 5,80 | 79,42       | 378,424   | 7,036                 | 10,933 | 19,333                      | 80,567                 |
| 13 | Wortel | 5%    | 89,495   | 5,78 | 207,90      | 395,148   | 5,854                 | 24,300 | 24,667                      | 93,750                 |
| 14 | Wortel | 5%    | 87,841   | 5,78 | 211,41      | 411,169   | 5,873                 | 26,033 | 22,000                      | 94,617                 |
| 15 | Wortel | 5%    | 89,691   | 5,74 | 207,90      | 406,933   | 6,377                 | 23,900 | 21,000                      | 94,600                 |

Keberadaan NaCl (garam) meskipun tidak merubah pH larutan, namun merubah jumlah elektrolit (radikal) bebas di dalam larutan sampel. Prinsip analisis aktivitas antioksidan pada metode DPPH adalah pengikatan radikal bebas oleh DPPH (Molyneux, 2004). Peningkatan jumlah elektrolit hasil disosiasi NaCl menjadi Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup> memberikan tambahan radikal bebas, sedangkan DPPH sendiri merupakan senyawa yang bersifat sebagai radikal bebas. Jadi secara umum, tambahan radikal bebas dari Na<sup>+</sup> akan berikatan dengan senyawa antioksidan dan terdeteksi sebagai peningkatan aktivitas antioksidan. Keberadaan ion bebas Na<sup>+</sup> dan Cl<sup>-</sup> dalam larutan sampel bersama-sama dengan DPPH dapat berikatan (ionic bonding) secara acak, sehingga meningkatkan nilai aktivitas antioksidan yang terdeteksi (bias positif). Hasil penelitian ini melengkapi informasi terkait sensitivitas dan kemampuan deteksi metode DPPH untuk analisis aktivitas antioksidan. Kesimpulannya, Ion Na<sup>+</sup> yang terkandung dalam larutan garam mampu diserap oleh bahan pangan dan bersifat reaktif terhadap radikal bebas sehingga ketika dianalisis dengan metode DPPH, FRAP maupun Molybdenum terdeteksi sebagai antioksidan (bias positif) seperti halnya logam Selenium.

**D. STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta mengunggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui Simlitabmas.

Luaran wajib penelitian tahun pertama (2019) ini adalah sebuah Buku Ajar berjudul Antioksidan Bahan Pangan dan Pengukuran Aktifitasnya. Cover Buku Ajar tersebut seperti terlampir di bawah ini.



Gambar 3. Cover Buku Monograf (Luaran Wajib)

Buku Ajar tersebut telah mendapatkan sertifikat Hak Kekayaan Intelektual (HKI) yang merupakan luaran tambahan untuk penelitian tahun kedua (2020).





Gambar 4. Sertifikat Hak Cipta untuk Buku Monograf berjudul “Antioksidan Bahan Pangan dan Pengukuran Aktivitasnya”

**ANTIOXIDANT DETERMINATION METHODS WITH SPECIAL EMPHASIS ON THE EFFECT OF METAL ION : A REVIEW**

*Bernadeta Saedari, Webliana Lowisia, Probo Yulianto Nugraheni*  
Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University, Semarang, Indonesia

**Introduction**

- Antioxidants play important role in our life due to their capability to reduce or inhibit the oxidation process in human body as well as in foodstuffs and pharmaceuticals.
- Antioxidants are known to be involved in the defense mechanism against the pathologies, i.e. by attacking free radicals.
- Fruits and vegetables which are rich in vitamin C, vitamin E, beta-carotene and flavonoids are natural sources of antioxidants.
- Recently there is no database of antioxidant content present in foodstuffs yet, probably due to the diversity of chemical compounds therein.
- There are many antioxidant determination methods are available, each with its advantages and disadvantages.

**Purpose**

- This review provides information of 11 antioxidant determination methods, including among others mechanisms, standard procedures, advantages and disadvantages, also factors which affect the validity of the assay.

**Antioxidant Mechanism of Action**

- The reaction between radical (oxidant) and antioxidant runs via several oxidation-reduction reactions, which can be expressed as follows:  
 $A_{\text{antioxidant}} + \text{electron} \rightarrow A_{\text{radical}} \text{ (reduction)}$   
 $B_{\text{oxidant}} - \text{electron} \rightarrow B_{\text{radical}} \text{ (oxidation)}$   
 where A = oxidant, B = antioxidant
- The measurement of antioxidant, either the reduced or oxidized way not possible until now since there is no antioxidant indicator molecule which can be used. Therefore, one of the assay present will measure the change in oxidant/radical probe or measure the electron flow (Barnack, 1995).

**Type of antioxidant**

- Based on its function, antioxidant can be classified into two classes: (1) primary / chain-breaking antioxidants; (2) secondary / preventive antioxidants.
- Primary antioxidants that role to stabilize free radical by transferring either hydrogen or electron. It works by inhibiting either the initiation ( $L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$ ) or the propagation ( $L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$ ) step in the radical chain reaction, where  $L^{\bullet}$ : lipid radical; AH: antioxidant;  $L^{\bullet}$ : radical radical (Apuli et al., 2007).
- Secondary / preventive antioxidants consist of oxygen scavengers and metal chelator. Metal chelators such as EDTA will form stable complexes with pro-oxidant metals by utilizing the unpaired electrons in their structure. Magnitude of metal ion (iron, copper, etc.) can act as catalyst of chain reaction from initiation phase. This reaction can inhibit Fenton-type reactions:  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + \cdot OH$  (Cekic et al., 2013).

**Antioxidant Determination Methods**

Table 1. Antioxidant assay, its principle method and the effect of metal ion on its validity

| Antioxidant | Principle of the method  | Effect of metal ion  |
|-------------|--|--|
| 1. ABTS     | Antioxidant reduces the pre-generated radical, oxidized by AAPH or $2,2' \text{-azobis(2-amidinopropane)} \text{ dihydrochloride}$ (AAPH) (Re, 2012) | Antioxidant reacted with metal ion formed radical and decrease absorbance from reaction. EDTA addition to reaction is recommended (Zhu et al., 2015) |
| 2. FRAP     | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 3. DPPH     | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 4. ORAC     | Antioxidant reacts to peroxyl radical generated by AAPH (Re, 2012)   | Yes  |
| 5. SET      | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 6. FRAP     | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 7. Folin    | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 8. Trolox   | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 9. ABTS     | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |
| 10. FRAP    | Antioxidant reacts to ferric ion and form stable complex between ferric ion and antioxidant. Ferric ion is reduced to ferrous ion (Re, 2012)         | Yes  |

**Application of Antioxidant Assay for Food Products**

- In general, ORAC assay can measure antioxidant in most of food product, other hydro- or lipophilic with higher sensitivity compare to ABTS/FRAP assay (Cao et al., 1993).
- FRAP and DPPH assay were more recommended for meat product (Orlato et al., 2016)
- ABTS assay show a good sensitivity and rapid measurement for orange juice compound in ORAC assay (Zuhara et al., 2009).
- FRAP assay was also reported with good applicability to coffee, tea and diabetic beverages, except for grape and rum (Pillay et al., 2003).
- ORAC assay was used to measure antioxidant capacity in tea infusion and tea catechin (Roy et al., 2010).
- ABTS was reported to have better sensitivity than DPPH for measuring antioxidant in wheat products, since it has wider pH range (Ferre et al., 2013).

**Conclusion**

- Metal ion acts as stimulant for Fenton reaction and it may trigger some antioxidant that turn into pro-oxidant.
- Metal ion can also bind with ABTS and DPPH radical, leading to miscalculation of antioxidant value.
- Although ABTS and DPPH are frequently applied in research, the use of fluorescence radical instead of biologically-relevant radical lower their accuracy in representing the true reaction in food product.

**References (selected)**

Barnack, A. L., & Orsavy, M. (2012). Mechanism change in estimating antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 97, 310–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.036>

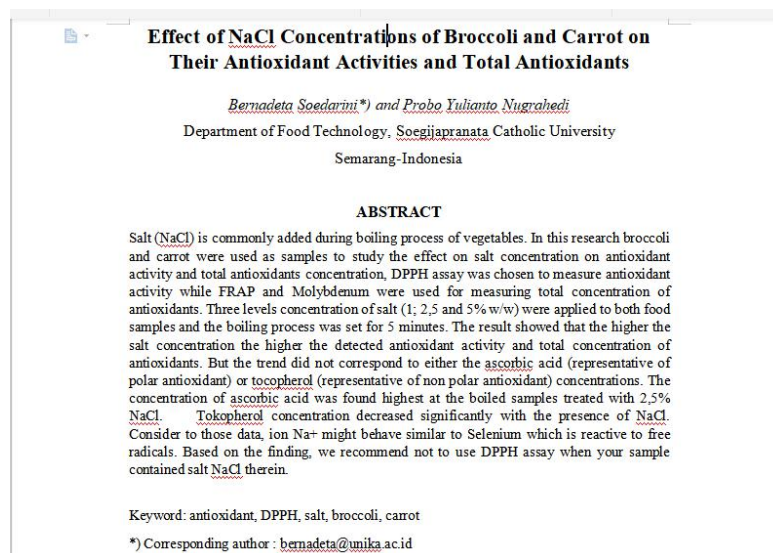
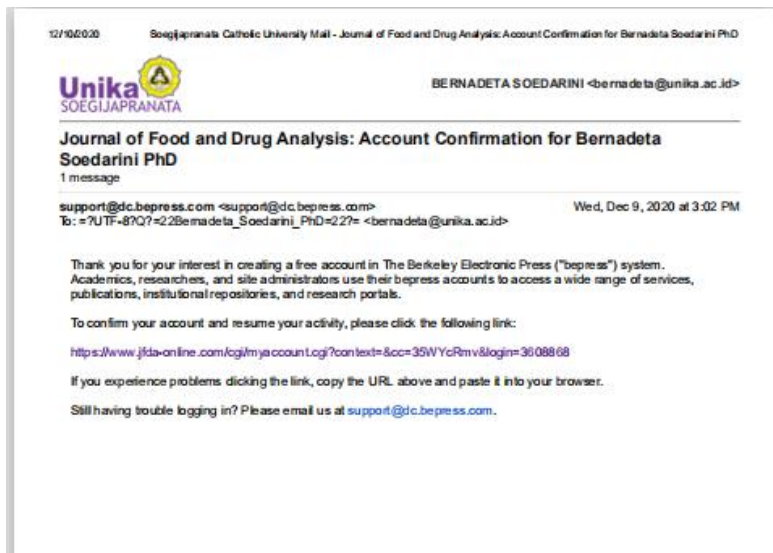
Epstein, M., Oko-Awu, C., Spillay, J., & Rodriguez, J. (2009). Determination of reactions between the radical and radical chloride ions and reaction catalyzed by EDTA and UV-vis technique. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1638–1643. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2009.06.015>

Nahdi, E., & Brat, P. (2011). Re-examination of the ORAC assay: Effect of metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(5), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4888-8>

Zuhara, A., Erveto, M. L., & Trigo, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.083>

Gambar 4. Poster yang dipresentasikan di 4<sup>th</sup> ICSAF Taipei Taiwan (6-7 November 2020)

Luaran wajib tahun kedua (2020) adalah artikel hasil penelitian yang dipublikasi di jurnal internasional. Journal internasional yang relevan: Journal of Food and Drug Analysis (<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-food-and-drug-analysis>).



Gambar 6. Luaran artikel journal internasional (JFDA)

**E. PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUP). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui Simlitabmas.

Penelitian Fundamental ini tidak mensyaratkan mitra kerjasama; namun demikian hasil penelitian ini akan dimanfaatkan oleh CFA (Center for Food and Agriculture), profit unit di bawah Fakultas Teknologi Pertanian UNIKA Soegijapranata yang bergerak di bidang jasa analisis kimia untuk bahan pangan dan hasil pertanian.

**F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Pelaksanaan penelitian, khususnya penelitian di laboratorium cukup terhambat akibat Pandemi COVID 19. Empat mahasiswa yang sedianya dapat membantu pelaksanaan analisis di laboratorium kemudian tidak dapat

melaksanakannya karena perkuliahan di UNIKA Soegijapranata sejak April dilakukan secara daring (online) serta kegiatan praktikum di laboratorium dirubah menjadi kegiatan yang juga berbasis daring (online). Hambatan dalam pengumpulan data penelitian ini kemudian juga berimbas pada penulisan artikel publikasi khususnya untuk jurnal internasional.

**G. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA:** Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Sebagai tindak lanjut dari temuan penelitian pada tahun pertama (2019) dan terkonfirmasi pada penelitian kedua (2020), maka telah ada pra-postulat tentang peran ion  $\text{Na}^+$  dari penambahan  $\text{NaCl}$  dalam bahan pangan yang bersifat reaktif terhadap radikal bebas, sehingga ketika dianalisis menggunakan metode DPPH, FRAP serta Molybdenum terlihat hasil yang lebih tinggi.

Temuan dan pra-postulat tersebut ditargetkan untuk dapat segera dipublikasikan di jurnal internasional. Beberapa jurnal internasional yang relevan yaitu Journal of Food and Drug Analysis (<https://www.journals.elsevier.com/journal-of-food-and-drug-analysis>).

Sebagai luaran tambahan, hasil atau temuan pada tahun ke-2 ditargetkan untuk didesiminasikan dalam 4<sup>th</sup> ICSAF (International Conference on Sustainable Agriculture and Food) di Taipei Taiwan. Hasil penelitian dwi-tahun ini juga akan diusulkan untuk diadopsi sebagai metode standard analisis antioksidan bahan pangan di CFA (Center for Food and Agrivulture) profit unit di bawah Fakultas Teknologi Pertanian UNIKA Soegijapranata yang bergerak di bidang jasa analisis kimia untuk bahan pangan dan hasil pertanian.

**H. DAFTAR PUSTAKA:** Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Huang, D.J., Ou, B.X., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assay. J. Agric. Food Chem; 53. Hal. 1841-1856.
2. Marinova and Batchvarov, 2011. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity of DPPH. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 17(1). Hal. 11-24
3. Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P., 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. Biochem. & Anal. Biochem. 1(1). Hal 2-8.
4. Sagar, B., Kedare and Sing, R.P., 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci Technol.; 48(4) Hal. 412–422.
5. [Cömert, E.D.](#) and [Gökmen, V.](#) , 2018. Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. [Food Res Int.](#) 105. Hal. 76-93.
6. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int J Biomed Sci. 2008;4(2):89-96.
7. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodriguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. Molecules 2012, 17, 5126–5138

Dokumen pendukung luaran Wajib #1

Luaran dijanjikan: Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional

Target: accepted/published

Dicapai: Submitted

Dokumen wajib diunggah:

1. Bukti submit
2. Naskah artikel

Dokumen sudah diunggah:

1. Naskah artikel
2. Bukti submit

Dokumen belum diunggah:

- Sudah lengkap

Nama jurnal: Journal of Food and Drug Analysis

Peran penulis: first author | EISSN: 10219498.

Nama Lembaga Pengindek: Elsevier

URL jurnal: <https://www.jfda-online.com/>

Judul artikel: NaCl Concentrations in Broccoli and Carrot Affect to Their Antioxidant Activities and Total Antioxidants

# **NaCl Concentrations in Broccoli and Carrot Affect to Their Detected Antioxidant Activities (DPPH) and Total Antioxidants (FRAP and Molybdenum)**

*Bernadeta Soedarini\*) and Probo Yulianto Nugrahedi*

Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University

Semarang-Indonesia

## **ABSTRACT**

Salt (NaCl) is commonly added during boiling process of vegetables. In this research broccoli and carrot were used as samples to study the effect on salt concentrations on antioxidant activity and total antioxidants concentration, DPPH assay was chosen for measuring antioxidant activity while FRAP and Molybdenum were used for measuring total concentration of antioxidants. Three levels concentration of salt (1; 2,5 and 5% w/w) were applied to both food samples and the boiling process was then performed for 5 minutes. The result showed that the higher the salt concentration the higher the detected antioxidant activity as well as total concentration of antioxidants. But the trend did not correspond to either the ascorbic acid (representative of polar antioxidant) or tocopherol (representative of non polar antioxidant) concentrations. The concentration of ascorbic acid was found highest at the boiled samples treated with 2,5% NaCl. Tokopherol concentration decreased significantly with the presence of NaCl. Consider to our findings, ion Na<sup>+</sup> might behave similar to Selenium which is reactive to free radicals. Based on the ]finding, we conclude that DPPH assay tends to give higher when your sample contained salt NaCl therein.

Keyword: antioxidant, DPPH, salt, broccoli, carrot

\*) Corresponding author : bernadeta@unika.ac.id

---

## **Introduction**

Vegetables and fruits are sources of natural antioxidants. Antioxidant compounds in vegetables and fruits among others are phenolic, flavonoids, lycopene, carotenoids and glucosinolates. Antioxidants are substances with special function to defense against oxidative stress in human body. Oxidative stress has been reported to cause chronic degenerative diseases such as cancer, arthritis, aging, autoimmune disorders and cardiovascular (Pham-Huy LA, et al., 2008). The ability of antioxidants to defense against oxidative stress due to their act as “free radical scavengers” in cells. In general there are three mechanism reactions between antioxidants and free radicals, which are (a) single electron transfer (SET), (b) hydrogen atom transfer (HAT) and (c) metal chelating



agent. Among the antioxidant determination methods, DPPH is the most popular method for determining antioxidant activity (capacity). DPPH method is simple, fast and inexpensive; but the disadvantage are the chance of radical to interact with other radicals, and also the time response curve is not linear with different ratio of antioxidant and DPPH [Arteaga, et al., 2012]. Further, in quantitative analysis, DPPH might have problem because of interference of absorbance with compounds present in sample [Kedare and Singh, 2011]. Some metal ions were able to suppress the rate of reaction by forming complexes with reagent. DPPH and that could reduce the sensitivity of the assay (Dawidowicz and Olszowy 2011). Another possibility is the activation of antioxidant functional group such as phenolic that leading to false positive read (Samsonowicz and Regulska 2016). Therefore, phenolic compounds were known to have prooxidant tendency when there are specific metal ion in the system (Huang *et al.*, 2005). Further research reported that majority of metal ion (calcium > potassium > cadmium > zinc > ferric > copper > nickel > mercury > aluminum > cobalt > silver; mentioned in the order of suppression) suppress DPPH rate of BHT. Other research also reported suppression effect of both Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> toward DPPH assay from which the decrease of antioxidant activity was in line with the metal ion concentration. However, a false increase of absorbance due to metal ion had also been reported. A significant increase of absorbance in DPPH assay due to Al<sup>3+</sup> cation (0.125 mol L<sup>-1</sup>) was found in savory extract (acetone, ethanol, methanol, water extract). In this case, the disturbance was more significant when lower concentration of antioxidant are present in the extract. The same rule also apply to metal ion concentration. The higher the cation concentration, the bigger false increase can be observed on the assay result. In several concentration and solvent (example: low concentration of metal ion in aqueous extract), aluminium cation show no disturbance. Extract with high concentration of antioxidant activity was found to be less affected by the presence of metal ion. Other than that, solvent used for extraction also affect the degree of disturbance (ethanol = methanol > water > acetone, the degree of disturbance was more significant as the list goes) (Samsonowicz and Regulska 2016).

## **Material and Methods**

Broccoli, carrot and salt were collected from local supermarket “Superindo” in Semarang Indonesia in September 2020. Broccoli and carrot were cleaned up thoroughly by soaking in cold tap water for about 5 minutes then rinsing under cold tap

water. Broccoli florets were prepared by using a sharp melamine knife to cut the stem away from the crown. The broccoli florets and carrot were then sliced into bite-sized pieces.

Brines with different NaCl concentrations (1; 2,5; 5% w/w) were prepared by dissolving 10 ; 25 and 50 g salt (NaCl) thoroughly with aquadest in 1L volumetric flask until their correct volume. Each sample of Broccoli and Carrot weight 100g were added into 500 ml of boiled brine. Boiling process was set for 5 minutes.

#### DPPH assay

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) was purchased from Sigma–Aldrich while Ascorbic acid and Tocopherol were purchased from E. Merck. Other chemicals used in this research were all analytical grade. Stock solutions of DPPH were prepared in methanol. All measurements were done in triplicates. DPPH assay measurements used spectrophotometer UV-Vis and were done at 517 nm.

#### FRAP assay

Measure the change in reduction rate of ferric ( $Fe^{3+}$ ) to ferrous iron ( $Fe^{2+}$ ) in correlation to antioxidant addition in the presence of tripyridyltriazine tridentate ligand (TPTZ). Later, the ligand will form color complex (change from pale yellow to blue) with ferrous iron which determined at the wavelength of 593 nm. FRAP assay need to be conducted on acidic pH (3.6) and can be completed in 4 minutes.

#### Phosphomolybdenum assay

Phosphomolybdenum method was used for measuring total antioxidants.. 3 ml of the reagen consist of  $H_2SO_4$  (0.6 M), 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molibdate was reacted with 0.1 ml of the sample. The solution was mixed using the vortex before incubating for 90 minutes at 50C. The absorbance of the sample was then measured using a spectrophotometer at a wavelength of 695 nm. Vitamin C solution with a concentration of 0; 10; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 ppm is used as the standard series solutions.

#### Determination of Ascorbic Acid

The concentration of vitamin C was measured with HPLC (Shimadzu Japan). A total of 0.25 grams of sample was weighed and dissolved with 0.5% to 25 ml oxalic acid (E.Merck). The sample was then filtered with filter paper and a 0.45  $\mu m$  Minisart RC membrane filter. The mobile phase used in this research was methanol: oxalic acid (ration 27:73 v/v), a Nucleosil 100-5 C-18 column (Merck) equipped with a UV detector at a wavelength of 243 nm and a flow rate of 0.5 ml per minute.

#### Determination of Tocopherol

The a-tocopherol stock was prepared by dissolving 50 mg of a-tocopherol in 100 ml of methanol– acetonitrile (30:70 v/v), giving a final concentration 0.05). The mobile phase was methanol–acetonitrile (30:70 v/v), flow-rate 1.0 ml/min, detection wave- length 205 nm, temperature  $30 \pm 0.2$  oC.

## Result and Discussion

Broccoli and carrot were chosen because both vegetables are rich in antioxidants. Phenolics and Glucosinolate are antioxidants mostly found in broccoli (Nugrahed, 2015) while carrot are known to have antioxidants of polyphenolic compounds and carotenes (BYSTRICKÁ, 2015).

Table 1 and Table 2 showed that the higher the salt concentration the higher the detected antioxidant activity as well as total concentration of antioxidants.

Table 1. Antioxidant activity and Total antioxidant of broccoli samples

| Sample                    | DPPH<br>% discoloration | FRAP<br>Total antioxidant<br>mg/100g | Phospomolybdenum<br>Total antioxidant<br>mg/100g |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|
| Broccoli fresh            | 13.99 ± 0.42            | 437.7±2.7                            | 46.11±3.66                                       |
| Broccoli boiled           | 9.07 ±0.10              | 286.3±6.1                            | 40.89±1.35                                       |
| Broccoli boiled NaCl 1%   | 13.47±0.97              | 372.2±13.7                           | 44.00±4.26                                       |
| Broccoli boiled NaCl 2.5% | 16.10±0.58              | 468.8±4.1                            | 55.67±8.09                                       |
| Broccoli boiled NaCl 5%   | 19.10±0.25              | 549.8±0.3                            | 73.00±8,50                                       |

All values were in mean±deviation standard of 3 replicates

Table 2. Antioxidant activity and Total antioxidant of carrot samples

| Sample                   | DPPH<br>% discoloration | FRAP<br>Total antioxidant<br>mg/100g | Phospomolybdenum<br>Total antioxidant<br>mg/100g |
|--------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|
| Carrot fresh             | 6.71 ± 0.27             | 133.8±0.9                            | 23.56±2,22                                       |
| Carrot boiled            | 4.59±0.46               | 79.7±3.4                             | 18.22±3.56                                       |
| Carrot boiled NaCl 1%    | 5.99±0.23               | 79.6±4.4                             | 18.89±3.01                                       |
| Carroti boiled NaCl 2.5% | 6.87±0.17               | 80.8±0.6                             | 19.56±0.38                                       |
| Carrot boiled NaCl 5%    | 8.03±0.30               | 94.3±0.5                             | 22.56±1.90                                       |

All values were in mean±deviation standard of 3 replicates

## Conclusion

Based on the findings ion Na<sup>+</sup> might behave similar to Selenium which is reactive to free radicals. Therefore we conclude that DPPH assay tends to give higher when your sample contained salt NaCl therein.

### Acknowledgement

This research was financially supported by Directorate General of Higher Education and Ministry of Research and Technology, Republic Indonesia under the contract number 00555/H.2/LPPM/III/2020.

### References

1. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4(2):89-96.
2. Arteaga, J.F.; Ruiz-Montoya, M.; Palma, A.; Alonso-Garrido, G.; Pintado, S.; Rodriguez-Mellado, J.M. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. *Molecules* 2012, 17, 5126–5138.
3. Kedare, S.B ; Singh, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 2011, 48(4):412-22
4. Dawidowicz, Andrzej L., Dorota Wianowska, and Małgorzata Olszowy. On Practical Problems in Estimation of Antioxidant Activity of Compounds by DPPH Method (Problems in Estimation of Antioxidant Activity). *Food Chemistry* 2012, 131 (3): 1037–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.067>.
5. Samsonowicz, Mariola, and Ewa Regulska. Evaluation of Influence of Selected Metal Cations on Antioxidant Activity of Extracts from Savory (*Satureja Hortensis*)‡. *Chemical Papers* 2016, 70 (4): i–ix. <https://doi.org/10.1515/chempap-2016-0001>.
6. Nugrahedi, P.Y; Glucosinolates during preparation of Brassica vegetables in Indonesia. WU Thesis. Wageningen University 2015, <https://edepot.wur.nl/341827>
7. BYSTRICKÁ, Judita et al. Carrot (*Daucus carota* L . ssp. sativus (Hoffm.) Arcang.) as source of antioxidants. *Acta agriculturae Slovenica*, [S.l.], v. 105, n. 2, p. 303–311, nov. 2015. ISSN 1854-1941. Available at: <http://ojs.aas.bf.uni-lj.si/index.php/AAS/article/view/54>>. Date accessed: 10 Dec. 2020. doi:<http://dx.doi.org/10.14720/aas.2015.105.2.13>.



BERNADETA SOEDARINI &lt;bernadeta@unika.ac.id&gt;

---

## Journal of Food and Drug Analysis: Account Confirmation for Bernadeta Soedarini PhD

1 message

---

**support@dc.bepress.com** <support@dc.bepress.com>

Wed, Dec 9, 2020 at 3:02 PM

To: =?UTF-8?Q?=22Bernadeta\_Soedarini\_PhD=22?= <bernadeta@unika.ac.id>

Thank you for your interest in creating a free account in The Berkeley Electronic Press ("bepress") system. Academics, researchers, and site administrators use their bepress accounts to access a wide range of services, publications, institutional repositories, and research portals.

To confirm your account and resume your activity, please click the following link:

<https://www.jfda-online.com/cgi/myaccount.cgi?context=&cc=35WYcRmv&login=3608868>

If you experience problems clicking the link, copy the URL above and paste it into your browser.

Still having trouble logging in? Please email us at [support@dc.bepress.com](mailto:support@dc.bepress.com).



Dokumen pendukung luaran Tambahan #1

Luaran dijanjikan: Prosiding dalam pertemuan ilmiah Internasional

Target: sudah terbit/sudah dilaksanakan

Dicapai: Accepted

Dokumen wajib diunggah:

1.

Dokumen sudah diunggah:

1. Naskah artikel

Dokumen belum diunggah:

-

Peran penulis: first author

Nama Konferensi/Seminar: 4th ICSAF (International Conference on Global Sustainable Agriculture and Food)

Lembaga penyelenggara: Fu Jen Catholic University, Taipei - Taiwan

Tempat penyelenggara: Taipei, Taiwan

Tgl penyelenggaraan mulai: 6 November 2020 | Tgl selesai: 7 November 2020

Lembaga pengindeks: NA

URL website: <https://icsaf.org>

Judul artikel: Antioxidant Determination Methods with Special Emphasis on the Effect of Metal Ion : A Review



*Bernadeta Soedarini, Webiana Lowisia, Probo Yulianto Nugraedi*

Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University, Semarang, Indonesia

## Introduction

- ❖ Antioxidants play important role in our life due to their capability to reduce or inhibit the oxydation process in human body as well as foodstuffs and parmaceuticals.
- ❖ Antioxidants are known to be involved in the defense mechanism against the pathologies, i.e. by attacking free radicals.
- ❖ Fruits and vegetables which are rich in vitamin C, vitamin E, beta-carotene and flavonoids are natural sources of antioxidants.
- ❖ Recently there is no database of antioxidant contents present in foodstuffs yet, probably due to the diversity of chemical compounds therein.
- ❖ There are many antioxidant determination methods are available, each with its advantages and disadvantages.

## Purpose

- ❖ This review provides information of 11 antioxidant determination methods, including among others mechanisms, standard procedures, advantages and disadvantages, also factors which affect the validity of the assay.

## Antioxidant Mechanism of Action

- ❖ The reaction between radical (oxidant) and antioxidant revolves around oxidation-reduction reaction, which can be expressed is as follow :



where A = oxidant; B= antioxidant

- ❖ The measurement of antioxidant, either the reduced or oxidized were not possible until now since there is no antioxidant indicator molecule which can be used. Therefore, most of the assay present will measure the change in oxidant/radical probe or measure the electron flow (Buettner, 1993).

## Type of antioxidant

- ❖ Based on its function, antioxidant can be classified into two classes: (1) primary / chain-breaking antioxidant; (2) secondary / preventive antioxidant.
- ❖ **Primary antioxidant** has the role to stabilize free radical by transferring either hydrogen or electron. It works by inhibiting, either the initiation ( $L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$ ) or the propagation  $LO^{\bullet} + AH \rightarrow LOH + A^{\bullet}$  step in the radical chain reaction; where L<sup>•</sup>: lipid radical; AH: antioxidant; LO<sup>•</sup> : alkoxy radical (Apak et al., 2007)
- ❖ **Secondary / preventive antioxidants** consist of oxygen scavengers and metal chelator. Metal chelators such as EDTA will form stable complex with prooxidant metals by utilizing the unpaired electron in their structure. Majority of metal ion (iron, copper, etc.) can act as catalyst of chain reaction from initiation phase. This reaction can inhibit Fenton-type reactions  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^{\bullet}$  (Çekiç et al., 2013).

## Antioxidant Determination Methods

Table 1. Antioxidant assay, its principle method and the effect of metal ion on its validity

| No. | Antioxidant assay          | Principle of the method  | Effect of metal ion   |
|-----|----------------------------|--|---|
| 1   | ORAC                       | Antioxidant reaction with peroxy radicals, induced by AAPH or 2,2'-azobis-2-amidino-propane (Schaich et al., 2015)   | Antioxidant reacted with metal ion instead of radical and florescent which lead to lower sensitivity. EDTA addition in the assay is recommended (Nkhili & Brat, 2011).                |
| 2   | TRAP                       | Antioxidant capacity to scavenge luminol-derived radicals, generated from AAPH decomposition (Ghiselli et al., 1995)   | NA  |
| 3   | TOSC                       | Antioxidant inhibition toward ethylene production in the reaction between oxygen radical species (peroxyl, hydroxyl, alkoxy) and $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methiolbutyric acid (Winston et al., 1998). | NA  |
| 4   | HORAC                      | Antioxidant capacity to quench OH radicals generated by a Co(II) based Fenton-like system (Ou et al., 2002)  | NA  |
| 5   | SET                        | Antioxidant capability to transfer electron or reducing oxidant compound i.e. radical, metal ion (Apak et al., 2016)   | Reduce the capability of antioxidant on transferring electron (Apak et al., 2016)   |
| 6   | FRAP                       | Antioxidant reaction with a Fe(III) Complex ((Benzie & Strain, 1996)   | NA  |
| 7   | Folin-Ciocalteu            | Hydrophilic antioxidants reaction with molybdates (Singleton, Orthofer, & Lanza-Raventos, 1999)  | Reduce the number of free hydroxyl group thus lower read of antioxidant value (Espinoza et al., 2009).  |
| 8   | Ferricyanide-Prussian blue | Antioxidant in $H_2PO_4$ or $HPO_4^{2-}$ buffer with added $Fe^{3+}$ will produce Prussian blue (Berker et al., 2010)  | NA  |
| 9   | DPPH                       | Antioxidant reaction with an organic radical (Hogg, Lohmann, & Russell, 1961)  | Reducing assay sensitivity due to complex formation with DPPH radical (Dawidowicz & Olszowy, 2012).   |
| 10  | ABTS / TEAC                | Antioxidant reaction with an organic cation radical ((Amao et al., 1996)   | Reducing assay sensitivity due to complex formation with ABTS radical (Dawidowicz & Olszowy, 2012) and intercepting electron transferred by antioxidant (Dawidowicz & Olszowy, 2011). |
| 11  | DMPD                       | Hydrophilic antioxidant reaction with hydrogen or electron resulted in discoloration of a chromogen (Fogliano et al., 1999)  | NA  |

## Application of Antioxidant Assay for Food Products

- ❖ In general, ORAC assay can measure antioxidant in most of food product, either hydro- or lipophilic with higher sensitivity compare to ABTS/TEAC assay (Cao et al., 1993).
- ❖ FRAP and DPPH assay were more recommended for meat product (Ortuño et al., 2016)
- ❖ ABTS assay show a good sensitivity and rapid measurement for orange juice compared to ORAC assay (Zulueta et al., 2009).
- ❖ FRAP assay was also reported with good applicability to coffee, tea and alcoholic beverages, except for grappa and rum (Pellegrini et al., 2003).
- ❖ ORAC assay was used to measure antioxidant capacity in tea infusion and tea catechin (Roy et al., 2010).
- ❖ ABTS was reported to have better sensitivity than DPPH for measuring antioxidant in wheat products, since it has wider pH range (Ferri et al., 2013).

## Conclusion

- ❖ Metal ion acts as stimulant for Fenton-reaction and it may trigger some antioxidant that turn into pro-oxidant.
- ❖ Metal ion can also bind with ABTS and DPPH radical, leading to miscalculation of antioxidant value.
- ❖ Although ABTS and DPPH are frequently applied in research, the use of fluorescence radical instead of biologically-relevant radical lower their accuracy in representing the true reaction in food product.

## References (selected)

Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2012). Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 97, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.036>.

Espinoza, M., Olea-Azar, C., Speisky, H., & Rodríguez, J. (2009). Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1638–1643. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.06.015>

Nkhili, E., & Brat, P. (2011). Reexamination of the ORAC assay: Effect of metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(5), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4884-8>

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>



ICSAF  
2020  
November 6th to 7th  
TAIWAN

ICSAF 20

# FUTURE TRENDS IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY

4th International Conference on Sustainable  
Global Agriculture and Food (ICSAF 2020)

## Acceptance Letter

October 28, 2020

Dear Dr. Bernadeta Soedarini,

We are very pleased to confirm that your submission entitled below has been accepted for the 4<sup>th</sup> ICSAF in New Taipei City, Taiwan, November 6-7, 2020.

### **Antioxidant Determination Methods with Special Emphasis on the Effect of Metal Ion : A Review**

Paper ID: ICSAF-P005 [RF]

Presentation Type: Poster

Authors: Bernadeta Soedarini, Webiana Lowisia, Probo Yulianto Nugrahedi

Affiliation: Soegijapranata Catholic University

Session/Topic: Review of current trends in food science and technology

Please check the conference information given on the ICSAF 2020 in Taiwan website (<https://icsaf.org/>) for the details of registration and paper upload process. The presentation guideline and format was shown in the conference website. You can check the session you will be presenting from the conference program to be announced on the website soon.

We look forward to your presentation and participation in ICSAF 2020. Please do not hesitate to contact us should you require further information and/or guidance.

Yours Sincerely,



Prof. Bing-Huei Chen  
Chairman of the Organizing Committee

ICSAF



*Bernadeta Soedarini, Webiana Lowisia, Probo Yulianto Nugraedi*

Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University, Semarang, Indonesia

## Introduction

- ❖ Antioxidants play important role in our life due to their capability to reduce or inhibit the oxydation process in human body as well as foodstuffs and parmaceuticals.
- ❖ Antioxidants are known to be involved in the defense mechanism against the pathologies, i.e. by attacking free radicals.
- ❖ Fruits and vegetables which are rich in vitamin C, vitamin E, beta-carotene and flavonoids are natural sources of antioxidants.
- ❖ Recently there is no database of antioxidant contents present in foodstuffs yet, probably due to the diversity of chemical compounds therein.
- ❖ There are many antioxidant determination methods are available, each with its advantages and disadvantages.

## Purpose

- ❖ This review provides information of 11 antioxidant determination methods, including among others mechanisms, standard procedures, advantages and disadvantages, also factors which affect the validity of the assay.

## Antioxidant Mechanism of Action

- ❖ The reaction between radical (oxidant) and antioxidant revolves around oxidation-reduction reaction, which can be expressed is as follow :



where A = oxidant; B= antioxidant

- ❖ The measurement of antioxidant, either the reduced or oxidized were not possible until now since there is no antioxidant indicator molecule which can be used. Therefore, most of the assay present will measure the change in oxidant/radical probe or measure the electron flow (Buettner, 1993).

## Type of antioxidant

- ❖ Based on its function, antioxidant can be classified into two classes: (1) primary / chain-breaking antioxidant; (2) secondary / preventive antioxidant.
- ❖ **Primary antioxidant** has the role to stabilize free radical by transferring either hydrogen or electron. It works by inhibiting, either the initiation ( $L^{\bullet} + AH \rightarrow LH + A^{\bullet}$ ) or the propagation  $LO^{\bullet} + AH \rightarrow LOH + A^{\bullet}$  step in the radical chain reaction; where L<sup>•</sup>: lipid radical; AH: antioxidant; LO<sup>•</sup> : alkoxy radical (Apak et al., 2007)
- ❖ **Secondary / preventive antioxidants** consist of oxygen scavengers and metal chelator. Metal chelators such as EDTA will form stable complex with prooxidant metals by utilizing the unpaired electron in their structure. Majority of metal ion (iron, copper, etc.) can act as catalyst of chain reaction from initiation phase. This reaction can inhibit Fenton-type reactions  $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH + OH^{\bullet}$  (Çekiç et al., 2013).

## Antioxidant Determination Methods

Table 1. Antioxidant assay, its principle method and the effect of metal ion on its validity

| No. | Antioxidant assay          | Principle of the method  | Effect of metal ion   |
|-----|----------------------------|--|---|
| 1   | ORAC                       | Antioxidant reaction with peroxy radicals, induced by AAPH or 2,2'-azobis-2-amidino-propane (Schaich et al., 2015)   | Antioxidant reacted with metal ion instead of radical and florescent which lead to lower sensitivity. EDTA addition in the assay is recommended (Nkhili & Brat, 2011).                |
| 2   | TRAP                       | Antioxidant capacity to scavenge luminol-derived radicals, generated from AAPH decomposition (Ghiselli et al., 1995)   | NA  |
| 3   | TOSC                       | Antioxidant inhibition toward ethylene production in the reaction between oxygen radical species (peroxyl, hydroxyl, alkoxy) and $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methiolbutyric acid (Winston et al., 1998). | NA  |
| 4   | HORAC                      | Antioxidant capacity to quench OH radicals generated by a Co(II) based Fenton-like system (Ou et al., 2002)  | NA  |
| 5   | SET                        | Antioxidant capability to transfer electron or reducing oxidant compound i.e. radical, metal ion (Apak et al., 2016)   | Reduce the capability of antioxidant on transferring electron (Apak et al., 2016)   |
| 6   | FRAP                       | Antioxidant reaction with a Fe(III) Complex ((Benzie & Strain, 1996)   | NA  |
| 7   | Folin-Ciocalteu            | Hydrophilic antioxidants reaction with molybdates (Singleton, Orthofer, & Laniuela-Raventos, 1999)   | Reduce the number of free hydroxyl group thus lower read of antioxidant value (Espinoza et al., 2009).  |
| 8   | Ferricyanide-Prussian blue | Antioxidant in $H_2PO_4$ or $HPO_4^{2-}$ buffer with added $Fe^{3+}$ will produce Prussian blue (Berker et al., 2010)  | NA  |
| 9   | DPPH                       | Antioxidant reaction with an organic radical (Hogg, Lohmann, & Russell, 1961)  | Reducing assay sensitivity due to complex formation with DPPH radical (Dawidowicz & Olszowy, 2012).   |
| 10  | ABTS / TEAC                | Antioxidant reaction with an organic cation radical ((Amao et al., 1996)   | Reducing assay sensitivity due to complex formation with ABTS radical (Dawidowicz & Olszowy, 2012) and intercepting electron transferred by antioxidant (Dawidowicz & Olszowy, 2011). |
| 11  | DMPD                       | Hydrophilic antioxidant reaction with hydrogen or electron resulted in discoloration of a chromogen (Fogliano et al., 1999)  | NA  |

## Application of Antioxidant Assay for Food Products

- ❖ In general, ORAC assay can measure antioxidant in most of food product, either hydro- or lipophilic with higher sensitivity compare to ABTS/TEAC assay (Cao et al., 1993).
- ❖ FRAP and DPPH assay were more recommended for meat product (Ortuño et al., 2016)
- ❖ ABTS assay show a good sensitivity and rapid measurement for orange juice compared to ORAC assay (Zulueta et al., 2009).
- ❖ FRAP assay was also reported with good applicability to coffee, tea and alcoholic beverages, except for grappa and rum (Pellegrini et al., 2003).
- ❖ ORAC assay was used to measure antioxidant capacity in tea infusion and tea catechin (Roy et al., 2010).
- ❖ ABTS was reported to have better sensitivity than DPPH for measuring antioxidant in wheat products, since it has wider pH range (Ferri et al., 2013).

## Conclusion

- ❖ Metal ion acts as stimulant for Fenton-reaction and it may trigger some antioxidant that turn into pro-oxidant.
- ❖ Metal ion can also bind with ABTS and DPPH radical, leading to miscalculation of antioxidant value.
- ❖ Although ABTS and DPPH are frequently applied in research, the use of fluorescence radical instead of biologically-relevant radical lower their accuracy in representing the true reaction in food product.

## References (selected)

- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2012). Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 97, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.036>.
- Espinoza, M., Olea-Azar, C., Speisky, H., & Rodríguez, J. (2009). Determination of reactions between free radicals and selected Chilean wines and transition metals by ESR and UV-vis technique. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71(5), 1638–1643. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.06.015>
- Nkhili, E., & Brat, P. (2011). Reexamination of the ORAC assay: Effect of metal ions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(5), 1451–1458. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4884-8>
- Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.033>



Abstract submission deadline: Sep xx, 2020

I would like to attend and present:  Oral  X Poster  Oral and Poster

## **Antioxidant Determination Methods with Special Emphasis on the Effect of Metal Ion : A Review**

Bernadeta Soedarini, Webiana Lowisia, Probo Yulianto Nugrahedhi

Department of Food Technology, Soegijapranata Catholic University Semarang, Indonesia

### **Abstract**

Numerous measurement methods for determining antioxidant value of food products had been reported, ranging from hydrogen atom transfer (HAT)-type mechanism; single electron transfer (SET) to the mixed of both mechanisms. In this review, we elaborated 13 assays with regard to their mechanisms, standard procedures, advantages and disadvantages, also factors which affect the validity of the assay. Special emphasis on the effect of metal ion toward the validity of antioxidant assay is discussed. Metal ion acts as stimulant for Fenton-reaction and it may trigger some antioxidant that turn into pro-oxidant. It can also bind with ABTS and DPPH radical, leading to miscalculation of antioxidant value. Although ABTS and DPPH are frequently applied in research, the use of fluorescence radical instead of biologically-relevant radical lower their accuracy in representing the true reaction in food product. Additionally, QUENCHER type of ABTS, DPPH and other assay had been proposed to eliminate the need of solvent extraction and lower the preparation time.

Keywords: *antioxidant, DPPH, ion, metal, methods*

### **\*Presenting author information**

Full name: Bernadeta Soedarini

Email: bernadeta@unika.ac.id

Telephone: +62 85869849663



Dokumen pendukung luaran Tambahan #2

Luaran dijanjikan: Hak Cipta

Target: granted

Dicapai: Bersertifikat

Dokumen wajib diunggah:

1. Deskripsi dan spesifikasi ciptaan
2. Sertifikat hak cipta

Dokumen sudah diunggah:

1. Deskripsi dan spesifikasi ciptaan
2. Sertifikat hak cipta

Dokumen belum diunggah:

-

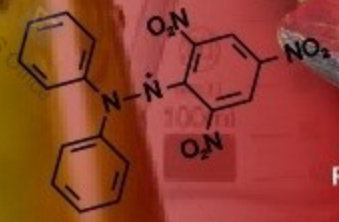
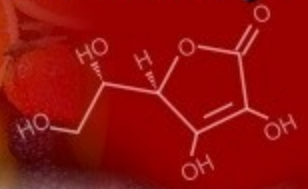
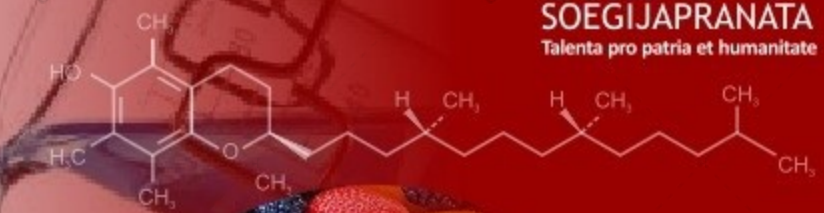
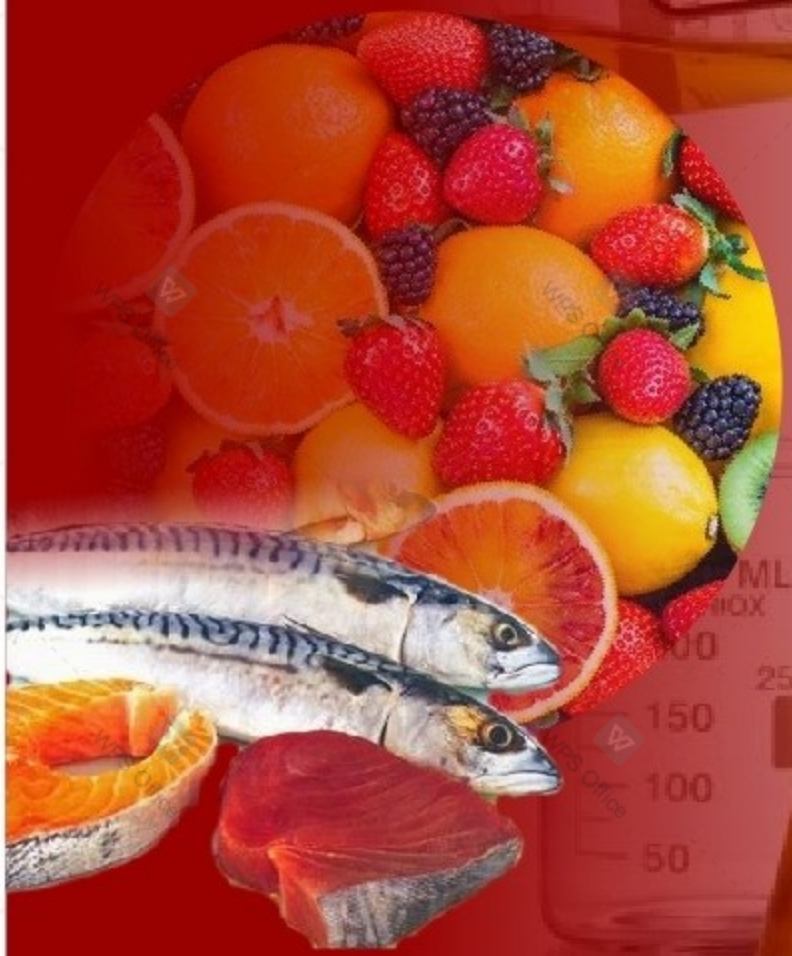
Nama Ciptaan: Buku Monograf "ANTIOKSIDAN BAHAN PANGAN DAN PENGUKURAN AKTIVITASNYA"

Pemegang Hak Cipta: Soedarini, R. Probo Yulianto Nugrahedhi

No Pencatatan: EC00201988001,

Tgl Pencatatan: 10 Desember 2018

# Antioksidan Bahan Pangan & Pengukuran Aktifitasnya



BERNADETA SOEDARINI  
R. PROBO Y. NUGRAHEDI

UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA  
2019

# **ANTIOKSIDAN BAHAN PANGAN**

**Dan Pengukuran Aktivasnya**

*Soedarini*

*R. Probo Yulianto Nugrahedhi*

Semarang, 2019

# Kata Pengantar

Istilah antioksidan sesungguhnya bermakna sangat ilmiah karena menyangkut reaksi kimia yang tidak sederhana di dalam sel makhluk hidup atau melibatkan peran enzim serta radikal bebas. Namun dalam kehidupan sehari-hari istilah antioksidan juga sering disebut, terutama yang dikaitkan dengan upaya-upaya pencegahan penuaan dini, penuaan kulit serta pencegahan penyakit-penyakit degeneratif.

Dalam buku ini, secara khusus antioksidan dibahas secara cukup komprehensif mulai dari aspek bahan sumbernya (nabati, hewani, sintesis) status terkini serta berbagai metode pengukuran aktivitasnya. Pengetahuan mengenai antioksidan dalam bahan pangan lengkap dengan metode analisisnya perlu diketahui dan dipahami oleh mahasiswa program studi Teknologi Pangan maupun program studi Nutrisi karena memiliki pengaruh yang luas terhadap status kesehatan.

Atas tersusunnya buku ini, penulis ingin memberikan apresiasi kepada Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat (DRPM) DIKTI yang telah menyediakan dukungan dana melalui skim Penelitian Dasar Unggulan Perguruan Tinggi (PDUPT) tahun anggaran 2019.

Semoga Tuhan memberkati semua usaha kita demi Indonesia yang maju dalam pengembangan keilmuan tanpa meninggalkan keimanan.

Semarang, Desember 2019

Soedarini

# DAFTAR ISI

Hal.

**Halaman Kulit**

**Kata Pengantar**

**Daftar Isi**

**Bab Pendahuluan**

- 1 1.1. Antioksidan sebagai komponen fungsional untuk kesehatan
- 1.2. Peran antioksidan dalam pengembangan produk pangan olahan

**Bab Antioksidan Ditinjau dari Aspek Kimia**

- 2 2.1. Antioksidan dan radikal bebas
- 2.2. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan

**Bab 3 Sumber Antioksidan Alami: Nabati**

- 3.1. Antioksidan dalam buah-buahan
- 3.2. Antioksidan dalam sayur-sayuran

**Bab Sumber Antioksidan Alami: Hewani**

- 4 4.1. Antioksidan dalam ikan
- 4.2. Antioksidan dalam seafood yang lain

**Bab Antioksidan Non Alami (Sintetis)**

- 5 5.1. Antioksidan untuk lemak dan minyak
- 5.2. Tinjauan keamanan pangan antioksidan sintetis

**Bab Analisis Antioksidan**

- 6 6.1. Metode-Metode Analisis Antioksidan
- 6.2. Tinjauan Khusus: Pengaruh Ion  $\text{Na}^+$  dalam Uji DPPH

**Daftar Referensi**

## **BAB – 1**

# **PENDAHULUAN**



### **1.1. Antioksidan sebagai komponen fungsional untuk kesehatan**

Peran antioksidan sebagai komponen fungsional yang meningkatkan status kesehatan manusia sesungguhnya telah diketahui sejak lama. Menurut catatan sejarah pelayaran Amerika, pada tahun 1593 Sir Richard Hawkins telah menyarankan awak kapalnya yang menderita sariawan untuk menggunakan asam jeruk lemon sebagai obatnya. Jeruk lemon mengandung asam askorbat (vitamin C) yang merupakan salah satu senyawa antioksidan larut air. Selanjutnya penemuan fungsi vitamin E (tokopherol) sebagai peningkat kesuburan reproduksi pada tikus percobaan oleh Dr Herbert Evans dari University of California, Berkeley Amerika Serikat pada tahun 1922. Vitamin E yang terdapat pada biji gandum merupakan antioksidan larut lemak.

Penelitian tentang fungsionalitas antioksidan bagi manusia di era ini lebih banyak mengarah pada pencegahan penyakit-penyakit degenerative seperti diabetes mellitus dan penyakit jantung. Penelitian terkini menunjukkan penderita diabetes mengalami kekurangan antioksidan seperti kekurangan askorbat, glutathione, dan atau enzim superoksida dismutase. Lebih lanjut, beberapa studi menunjukkan bahwa kandungan serum dengan antioksidan tinggi (tokoferol) dapat menurunkan risiko terkena diabetes melitus tipe 2 (Sindhi et al., 2013).

Dalam kehidupan manusia, oksigen merupakan bagian yang sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia, khususnya untuk meregenerasi energi

tubuh. Ditinjau dari ilmu biokimiawi, regenerasi energi di dalam tubuh manusia tersebut terjadi melalui pembentukan ATP (Adenosin Tri Phospat) di mitokondria sel. Namun dalam proses pembentukan ATP tersebut, terbentuk pula produk lain yaitu senyawa radikal bebas yang bersifat toksik. Radikal bebas merupakan sejumlah molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan di kulit orbit terluar dari struktur kimia suatu senyawa. Keberadaan electron di orbit terluar tersebut menjadikan suatu senyawa bersifat tidak stabil dan sangat reaktif (Sen & Chakraborty, 2011). Radikal bebas yang berupa senyawa reaktif akan menangkap elektron dari molekul yang stabil untuk menstabilkan dirinya sendiri. Proses ini melewati 3 proses yang terdiri dari inisiasi yaitu proses pembentukan senyawa radikal, propagasi yaitu adanya reaksi antara senyawa radikal dengan molekul lain, dan terakhir terminasi yaitu terjadinya transformasi senyawa radikal menjadi produk lain (Carocho et al., 2017).

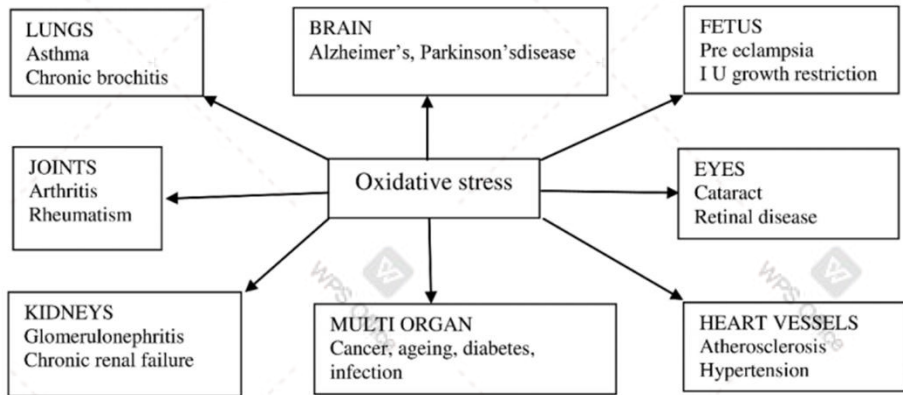
Senyawa radikal bebas terdiri dari ROS (*reactive oxygen species*) dan RNS (*reactive nitrogen species*). ROS terdiri dari radikal superoksida ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksil ( $\bullet OH$ ), peroksil ( $ROO\bullet$ ), lipid peroksil ( $LOO\bullet$ ), alkoksil ( $RO\bullet$ ). Sedangkan RNS terdiri dari nitrat oksida ( $NO\bullet$ ) dan nitrogen dioksida ( $NO_2\bullet$ ) (Pham-Huy et al., 2008 dalam Sen & Chakraborty, 2011). Senyawa radikal tersebut dapat menyebabkan penyakit alzheimer, parkinson, truk, diabetes, asma, alergi, kelainan gantung, dan lain-lain (Carocho et al., 2017). Sebesar  $\pm 5\%$  oksigen yang dihirup oleh manusia akan diubah menjadi beberapa spesies ROS seperti superoksida, hidroksil, dan hidrogen peroksida. Tumpukkan senyawa radikal bebas di dalam tubuh akan menciptakan kondisi yang

tidak seimbang antara jumlah radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh (oxidative stress). Selain proses pembentukan ATP, senyawa radikal bebas juga dapat berasal dari gaya hidup yang tidak terlalu sehat, paparan kimia, polusi, asap rokok, obat-obatan, dan lain-lain (Sen & Chakraborty, 2011).

Dalam melawan radikal bebas di dalam tubuh maka dibutuhkan antioksidan untuk mengubah senyawa tersebut menjadi non-radikal dan tidak membahayakan bagi tubuh. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menunda terjadinya oksidasi protein, karbohidrat, lemak, dan DNA pada konsentrasi rendah (Sindhi et al., 2013). Senyawa antioksidan akan melawan spesies radikal oksigen dan nitrogen yang dapat merusak jaringan tubuh dengan memberikan elektron atau atom hidrogen dari gugus hidroksil (Apak et al., 2008; Carocho et al., 2017). Selain itu, senyawa antioksidan juga akan merusak agen yang menyebabkan reaksi oksidasi terjadi (Benzie & Strain, 1996). Mekanisme lain dari antioksidan yaitu pengkelatan logam seperti  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Cu^{+}$ . Mekanisme ini penting untuk mencegah terjadinya reaksi logam dengan  $H_2O_2$  yang kemudian mengarah ke produksi radikal superoksida ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan menyebabkan pengembangan penyakit neurodegeneratif (Lü, et al., 2010 dalam Carocho et al., 2017).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa pembentukan radikal bebas dan jumlah antioksidan di dalam tubuh berkaitan dengan penyakit diabetes melitus. Antioksidan glutathion (GSH) dan glutathion peroksidase (GSH-Px) berperan dalam menghadapi oxidative stress di

dalam sel (Jialal et al., 2002 dalam Sindhi et al., 2013). Salah satu proses pembentukan senyawa radikal bebas yaitu proses auto-oksidasi glukosa (Naziroglu et al., 2005 dalam Sindhi et al., 2013).



Gambar 1. Pengaruh negative radikal bebas dalam tubuh manusia (Sarkar dan Ghosh, 2016)

## 1.2. Peran Antioksidan dalam Pengembangan Produk di Industri

Kandungan antioksidan bahan pangan makanan selalu menjadi perhatian para peneliti dan praktisi di bidang pangan sejak dulu kala. Selain berperan sebagai komponen fungsional bagi tubuh, antioksidan juga peran penting dalam mempertahankan kualitas bahan pangan. Berkat antioksidan, ketengikan pada bahan pangan berlemak dapat dihindari sehingga memiliki umur simpan yang lebih panjang. Oleh karenanya hingga kini praktek penggunaan antioksidan dalam industri makanan masih terus dipertahankan dan bahkan merupakan suatu keharusan. Untuk melindungi vitamin E yang terdapat dalam tepung terigu serta menghindari reaksi pencoklatan alami selama masa penyimpanannya, industry penggilingan tepung terigu umumnya menambahkan vitamin C dalam produknya. Berbagai bahan pangan

yang diketahui memiliki kandungan antioksidan banyak dicari dan digunakan sebagai bahan baku aneka produk pangan, bahkan juga produk farmasi.

Antioksidan mendukung upaya-upaya pengembangan produk yang dilakukan industri pengolahan makanan secara global. Antioksidan dari sumber alami relative murah dan mudah diaplikasikan pada hampir semua bahan makanan. Aplikasi antioksidan memiliki tujuan umum yang sama, untuk memperpanjang umur simpan produk olahan pangan baik dari khasiat (fungsionalitas) maupun karakteristik kualitas lainnya seperti rasa atau warna. Industri minyak kelapa sawit merupakan salah satu pelopor penggunaan antioksidan alami, yaitu beta-karoten yang memang sudah ada di dalam bahan bakunya.

Tren konsumen telah bergeser yaitu pada peningkatan kepedulian dan kesadaran akan nilai keamanan pangan, sehingga industri didorong untuk menemukan dan menggunakan antioksidan alami dibanding antioksidan sintetis.

## **BAB – 2**

# **ANTIOKSIDAN DITINJAU DARI ASPEK KIMIA**



## 2.1. Antioksidan dan Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom ataupun molekul tidak stabil yang terdiri dari satu atau lebih elektron tidak berikatan. Molekul tersebut diantaranya adalah atom hidrogen, logam transisi, dan molekul oksigen. Untuk mencapai kestabilan, molekul tersebut akan berikatan atau memotong elektron dari molekul lain yang ditemui. Dalam batas wajar, radikal bebas memiliki manfaat bagi kesehatan seperti memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah serta organ dalam tubuh. Sedang dalam jumlah berlebih, radikal bebas dapat menyebabkan stress oksidatif dalam tubuh yang berbahaya bagi kesehatan. Stress oksidatif sendiri terjadi ketika kecepatan pembentukan spesies oksigen reaktif melebihi kapasitas sel menyingkirkan spesies oksigen reaktif (Manduzio et al., 2015; Yuslianti, 2018; & Marks *et al.*, 2000).

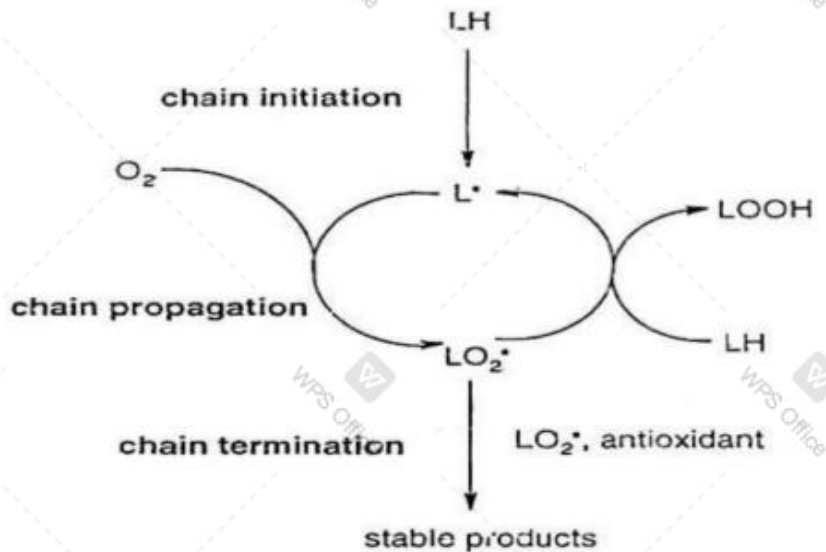
Radikal bebas sendiri dapat berasal baik dalam tubuh ataupun luar tubuh. Macam-macam atom dapat menjadi radikal bebas. Salah satunya adalah radikal hidroksil yang dianggap sebagai salah satu radikal bebas paling reaktif yang menyerang hampir setiap molekul dan inisiator reaksi berantai membentuk peroksidan lemak dan radikal organik. (Youngson, 1998; Marks *et al.*, 2000). Yuslianti (2018) menyebutkan selain radikal hidroksil terdapat juga radikal anion superoksida yang bersifat toksik bagi tubuh, dapat dihilangkan melalui substrat yang mengandung enzim katalase ataupun enzim GSH (glutation peroksidase).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menunda terjadinya oksidasi protein, karbohidrat, lemak, dan DNA pada konsentrasi

rendah (Sindhi et al., 2013). Senyawa antioksidan akan melawan spesies radikal oksigen dan nitrogen yang dapat merusak jaringan tubuh dengan memberikan elektron atau atom hidrogen dari gugus hidroksil (Apak et al., 2008; Carocho et al., 2017). Selain itu, senyawa antioksidan juga akan merusak agen yang menyebabkan reaksi oksidasi terjadi (Benzie & Strain, 1996). Mekanisme lain dari antioksidan yaitu pengkelatan logam seperti  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  dan  $Cu^{+}$ . Mekanisme ini penting untuk mencegah terjadinya reaksi logam dengan  $H_2O_2$  yang kemudian mengarah ke produksi radikal superoksida ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksil ( $\bullet OH$ ) dan menyebabkan pengembangan penyakit neurodegeneratif (Lü, et al., 2010 dalam Carocho et al., 2017).

Antioksidan glutathion (GSH) dan glutathion peroksidase (GSH-Px) berperan dalam menghadapi oxidative stress di dalam sel (Jialal et al., 2002 dalam Sindhi et al., 2013). Pada penderita diabetes ditemukan bahwa terdapat kekurangan antioksidan seperti kekurangan askorbat, glutathion, dan superoksida dismutrase. Salah satu proses pembentukan senyawa radikal bebas yaitu proses auto-oksidasi glukosa (Naziroglu et al., 2005 dalam Sindhi et al., 2013). Pada beberapa studi menunjukkan bahwa kandungan serum dengan antioksidan tinggi (tokoferol) dapat menurunkan risiko terkena diabetes melitus tipe 2 (Sindhi et al., 2013).

Reaksi yang disebabkan dari radikal bebas akan menyebabkan reaksi



Gambar 1. Reaksi oksidasi berantai

berantai (*chain reaction*). Diawali dengan radikal bebas yang menggabungkan diri dengan yang lain, melepas elektron atau menangkap satu elektron dari molekul lain untuk menjadi stabil. Molekul yang terserang akan menjadi radikal baru. Reaksi berantai ini bersifat sangat cepat dan juga merusak jaringan. Reaksi ini akan terus berlangsung sampai ada reaksi penghilangan dengan radikal bebas lainnya atau melalui sistem antioksidan dalam tubuh. Tahapan reaksi ini sendiri berawal dari pembentukan awal (inisiasi), perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap akhir (terminasi), yaitu pemusnahan atau pengubahan radikal bebas menjadi molekul stabil yang tidak reaktif (Yuslianti, 2018; Youngson, 1998).

Beberapa hal dapat memicu terbentuknya radikal bebas seperti radiasi, peradangan, merokok, ozon, penuaan, dan tekanan parsial oksigen yang lebih tinggi daripada normal meningkatkan pembentukan ROS. (Silalahi, 2006 & Marks *et al.*, 2000). Semua molekul biologis pada sel (asam nukleat, lemak, protein, dan polisakaradia) adalah substrat potensial dari ROS. Molekul biologis yang menjadi substrat potensial dari ROS akan mengalami reaksi berantai yang, jika dalam jumlah berlebih, dapat membahayakan bagi kesehatan. Beberapa penyakit berbahaya yang disebabkan oleh adanya radikal bebas adalah kanker, karena radikal bebas mampu menginisiasi ataupun menstimulasi karsinogenesis.

Tabel 1. Jenis Antioksidan Berdasarkan Sifat dan Mekanismenya

| Kelas antioksidan             | Sub-kelas antioksidan | Jenis antioksidan   |
|-------------------------------|-----------------------|---|
| Antioksidan Berdasarkan Sifat |                       |   |
| Enzimatik                     | -                     | Superoksida dismutasi (SOD), katalase (CAT), glutathion peroksidase (GPx), glutathion reduktase (GR)  |
|                               | Metabolik             | <i>Reduces glutathion</i> (GSH), asam lipoid, L-arginin, koenzim Q <sub>10</sub> , melatonin, asam urat, bilirubin, <i>metal-chelating protein</i> , transferin, dan lain-lain. |
| Non-Enzimatik                 | Nutrien               | Vitamin E, Vitamin C, karotenoid, <i>trace metal</i> (Se, Mn, Zn), flavonoid, omega-3, omega-6, dan lain-lain.  |

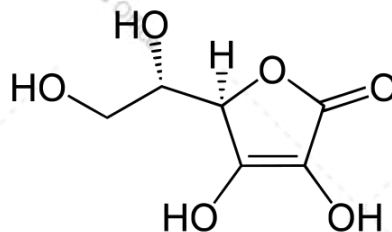
Lanjutan Tabel 2. Jenis Antioksidan Berdasarkan Sifat dan Mekanismenya

| <b>Kelas antioksidan</b>  | <b>Sub-kelas antioksidan</b> | <b>Jenis antioksidan</b>   |
|---|------------------------------|--|
| <b>Antioksidan Berdasarkan Sumber</b>                                   |                              |  |
| <i>Endogenous</i>   | -                            | Bilirubin, glutation, asam lemak, N-asetil sistein, NADPH dan NADH, ubiquinone (koenzim Q <sub>10</sub> ), asam urat, enzim (SOD, CAT, GPx, GR)    |
| <i>Dietary</i>  | -                            | Vitamin C, vitamin E, beta-karoten, karotenoid lain, oksikarotenoid (likopen dan lutein), polifenol (flavonoid, flavon, flavonol, proantosianidin) |
| <i>Metal Binding Protein</i>  | -                            | Albumin (Cu), seralotplasin (Cu), metalotionein (Cu), ferritin (Fe), mioglobin (Fe), transferin (Fe)   |
| <b>Antioksidan Berdasarkan Mekanisme</b>                                |                              |  |
| Sistem Katalitik (untuk menetralkan atau mengubah ROS)                  | -                            | SOD, CAT, GPx  |
| Mengikat/inaktivasi ion logam (mencegah produksi ROS)                   | -                            | Ferritin, cacruloplasin, kafein  |
| <i>self suicidal</i> dan memecah rantai antioksidan (menghancurkan ROS) | -                            | Vitamin C, vitamin E, asam urat, glutation, flavonoid  |
| <i>Quenching ROS, Chemical trap/seks to absorb energy</i>               | -                            | Karotenoid, antosianidin   |

Sumber : (Anwar *et al.*, 2018; Sen & Chakraborty, 2011)

Antioksidan dalam tubuh manusia (*endogenous antioxidant*) dibagi menjadi tiga kelompok yang terdiri dari :

- Kelompok pertama terdiri dari enzimatis dan non enzimatis : Superoksida dismutase (SOD), katalase (CAT), glutathione superoksida (GR), ceruloplasmin, ferritin, transferrin, albumin dan mineral seperti Se, Cu, Zn, dan lain-lain.
- Kelompok kedua terdiri dari antioksidan non enzimatis yang mampu menginaktivasi senyawa radikal secara cepat : Glutathione (GSH), vitamin C, albumin, vitamin E, karotenoid, flavonoid, dan lain-lain.
- 
- Kelompok ketiga terdiri dari susunan enzim yang berfungsi untuk memperbaiki kerusakan DNA, protein, dan oksidasi lemak serta peroksida : lipase, protease, transferase, metionin sulfoksida reduktase, dan lain-lain (Carocho *et al.*, 2017; Sindhi *et al.*, 2013).



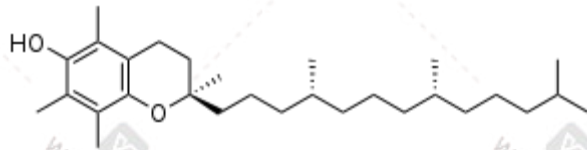
Gambar 2. Struktur Asam Askorbat

Vitamin C dan vitamin E merupakan antioksidan non-enzimatis yang paling umum ditemukan pada suatu komoditas dan produk pangan. Vitamin C dan vitamin E memiliki mekanisme antioksidan dengan melawan senyawa radikal peroksil dan radikal reaktif lainnya (Sen &



Chakraborty, 2011). Selain dalam produk pangan, vitamin C dan vitamin E sering ditemukan dalam bentuk suplemen makanan (Shebis *et al.*, 2013). Vitamin C biasa disebut dengan asam askorbat merupakan antioksidan larut air yang memiliki bentuk ester siklik dengan gugus keton di posisi  $\alpha$ , dan memiliki kemampuan memberikan 2 elektron pada molekul di sekitarnya (Carocho *et al.*, 2017). Sifat elektronegatif ringan dari asam askorbat menjadi penyebab asam askorbat mampu menyumbangkan elektron ke berbagai substrat seperti radikal hidroksil, nitrogen oksida reaktif, dan lain-lain (Cömert & Gökmen, 2017). Selain elektron, vitamin C juga memiliki 4 gugus  $-OH$  yang dapat memberikan ion hidrogen pada sistem oksidasi (Brewer, 2011). Vitamin C memiliki efek sinergis dengan vitamin E dengan meregenerasi vitamin E secara terus menerus (Carocho *et al.*, 2017). Vitamin C berperan sebagai agen pereduksi yang akan bereaksi dengan vitamin E yang bersifat radikal (telah mendonorkan ion hidrogen pada lipid yang teroksidasi) untuk meregenerasi vitamin E (Brewer, 2011). Bentuk radikal vitamin C yang memiliki elektron tindak berpasangan memiliki sifat stabil dan tidak reaktif. Mekanisme vitamin C sebagai antioksidan yaitu dengan menghilangkan (*scavange*) senyawa radikal superoksida dan hidroksi, menetralkan senyawa pengoksidasi, dan meregenerasi vitamin E. Kandungan senyawa vitamin C biasa ditemukan pada lemon, jeruk, bluberi, stroberi, anggur, minyak zaitun, minyak kelapa, kacang mede, kecambah, dan beberapa sayuran (Sen & Chakraborty, 2011). Vitamin C berperan sebagai kofaktor dalam reaksi enzimatik pembuatan kolagen. Selain itu, konsumsi vitamin C berguna dalam proses asimilasi protein dan pencegahan penyakit *scurvy* (Lucock *et al.*, 2013 dalam Shebis *et al.*, 2013). Daniel (1986) dalam Anwar *et al.*, 2018

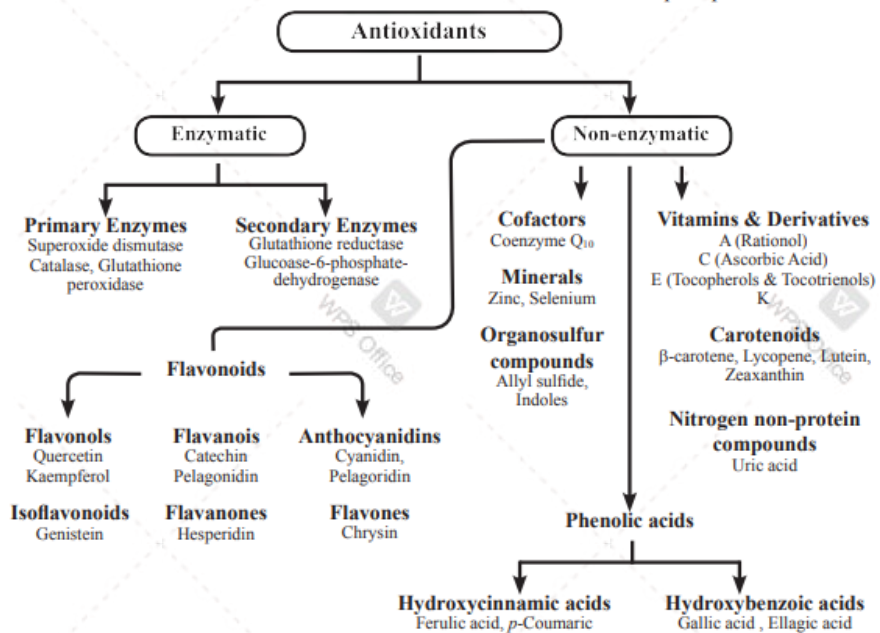
mengatakan bahwa konsumsi buah dan sayuran yang mengandung vitamin C direkomendasikan dikonsumsi dalam dosis kecil dikarenakan, konsumsi dalam jumlah besar akan menunjukkan penurunan penyerapan di dalam tubuh.



Gambar 3. Struktur  $\alpha$ -tokoferol

Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang dapat memecah rantai membran sel secara efektif dengan tujuan untuk melindungi membran asam lemak dari proses peroksidasi lipid. Pencegahan reaksi peroksidasi di membran seluler dan sub seluler fosfolip dapat terjadi dengan pemberian hidrogen kepada senyawa radikal peroksil pada PUFA (*poly unsaturated fatty acid*). Vitamin E merupakan senyawa yang terbentuk dari 8 stereoisomer yang terdiri dari ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tokoferol dan  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  tokotrienol), namun hanya bentuk  $\alpha$ -tokoferol yang memiliki sifat bioaktif pada manusia. Bentuk natural vitamin E yang memiliki 8 stereoisomer memiliki tingkat penyerapan dalam tubuh yang lebih tinggi dibandingkan dengan bentuk suplemen yang hanya diproduksi dalam bentuk  $\alpha$ -tokoferol. Mekanisme vitamin E sebagai antioksidan yaitu dengan menghilangkan (*scavange*) senyawa radikal superoksida dan hidroksil, meningkatkan aktivitas enzim antioksidan, memecah reaksi peroksidase lipid (Sen & Chakraborty, 2011). *Bioavailability* vitamin E lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin C yang larut air, hal ini dikarenakan kelarutan vitamin E pada makanan berlemak yang tinggi (Daniel, 1986 dalam Anwar *et al.*, 2018)..

Kandungan senyawa vitamin E biasa ditemukan pada buah ala (buah beri India), lemon, jeruk, minyak kacang tanah, minyak zaitun, minyak kelapa, kacang Ade, kecambah, dan kismis. Konsumsi vitamin E dapat melindungi tubuh dari beberapa penyakit seperti kanker, penyakit jantung, katarak, dan lain-lain (Sen & Chakraborty, 2011; Shebis *et al.*, 2013). Aktivitas antioksidan  $\alpha$ -tokoferol dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu 110<sup>0</sup>C aktivitas antioksidan  $\alpha$ -tokoferol menurun, dan pada suhu 150<sup>0</sup>C  $\alpha$ -tokoferol kehilangan kemampuan antioksidannya (Brewer, 2011).



Gambar 2. Penggolongan Antioksidan

Selain vitamin, terdapat senyawa antioksidan lain yaitu senyawa fenol. Sifat antioksidan dari senyawa fenol diakibatkan oleh adanya cincin

aromatik yang dapat menstabilkan dan memisahkan elektron tidak berpasangan pada strukturnya (Cömert & Gökmen, 2017). Beberapa senyawa polifenol terbentuk dari konjugasi antara mono dan polisakarida dengan cincin fenol serta gugus fungsional lainnya seperti ester dan metil ester (Baxter *et al.*, 1998 dalam Anwar *et al.*, 2018). Senyawa polifenol dapat ditemukan dalam berbagai jenis teh terutama teh hijau dan teh merah, dan juga buah seperti anggur (Baxter *et al.*, 1998 dalam Anwar *et al.*, 2018). Namun polifenol yang berasal dari teh memiliki *bioavailability* yang lebih signifikan dibandingkan dengan polifenol yang berasal dari anggur. Sebanyak 15-20% polifenol terserap dalam darah manusia. Peningkatan penyerapan polifenol dalam tubuh dapat terjadi ketika tidak terdapat molekul gula yang berikatan. Maka Penyerapan polifenol yang berasal dari teh lebih tinggi dibandingkan dengan buah yang memiliki kandungan gula yang tinggi (Carr *et al.*, 2000 dalam Anwar *et al.*, 2018). Senyawa fenol terbagi menjadi 6 kelompok umum yang terdiri dari flavonoid, asam fenolat, alkohol fenolat, stilbenes, lignan, tanin (Cömert & Gökmen, 2017). Flavonoid biasa ditemukan dalam berbagai makanan seperti kentang, gandum, tomat, beri merah, persik, dan kacang almond (Urquiaga & Leighton, 2000 dalam Anwar *et al.*, 2018). Selain itu terdapat senyawa polifenol lain yaitu antosianin yang terdapat dalam beri-berian dan *wine* merah. Jenis flavonoid ini memiliki *bioavailability* yang lebih rendah dibandingkan dengan senyawa flavonoid lainnya (Carr *et al.*, 2000 dalam Anwar *et al.*, 2018).

Konsumsi senyawa antioksidan dari sumber lain juga diperlukan oleh tubuh. Hal ini dikarenakan antioksidan dalam tubuh (*endogenous antioidant*) dalam tubuh tidak mampu menyerang sejumlah besar

radikal bebas. Antioksidan dalam bahan pangan mampu menekan radikal bebas dan dapat menghadapi kondisi *oxidative stress* (Carocho *et al.*, 2017).

## **BAB – 3**

# **SUMBER ANTIOKSIDAN ALAMI NABATI**

### 3.1 Antioksidan dalam buah

Antioksidan yang terkandung dalam sayuran secara umum berasal dari senyawa flavonoid, yaitu kelompok besar senyawa fenolik alami. Flavonoid seperti halnya catechin, quercetin, dihydroquercetin memiliki aktivitas dan fungsional sebagai antioksidan. Berbagai sayuran memiliki berbagai jenis flavonoid yang berbeda-beda serta dengan jumlah yang bervariasi. Quercetin, bagian dari flavonoid yang disebut flavonol, membentuk komponen antioksidan utama dalam sayuran. Quercetin dalam konsentrasi relative tinggi ditemukan dalam sayuran seperti brokoli, bawang, dan peterseli sayuran berdaun hijau lainnya.

Tomat, salah satu sayuran yang paling banyak diproduksi dan dikonsumsi di seluruh dunia, merupakan sumber likopen,  $\beta$ -karoten, folat, kalium, vitamin C (asam askorbat), asam klorogenat, flavonoid, plastoquinon, fenolik, tokoferol (vitamin E) dan xanthophylls. Nilai rata-rata yang diperoleh untuk antioksidan komponen dalam tiga kultivar segar adalah asam askorbat, 276 mg / 100 g bahan kering; total fenolat, setara 613 mg asam galat / 100 g bahan kering, dan likopen 38 mg / 100 g bahan kering. Vitamin C diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang sangat baik karena mampu menyumbangkan elektron untuk enzim, atau senyawa lain. Tomat relatif rendah beta-karoten, tetapi tinggi likopen, yaitu antioksidan aktif.

Likopen adalah antioksidan yang menarik karena cukup stabil untuk penyimpanan dan memasak, dan dengan demikian, hadir dalam tomat



yang sudah matang sering dikonsumsi, dan sebagian disebabkan oleh penyakit jantung bagian bawah dan risiko kanker. Selain itu, banyak penelitian epidemiologis menyarankan bahwa konsumsi tomat secara teratur dapat menyebabkan suatu penurunan kejadian insiden penyakit kardiovaskular, dan mengurangi risiko kanker payudara, usus besar, paru-paru, dan prostat. Oleoresin yang diperoleh dari tomat merah nonkomersial memiliki tinggi kandungan likopen dengan kapasitas antioksidan tinggi dan anti mutagenic aktivitas, menunjukkan bahwa layak untuk menggunakan ini untuk mendapatkan oleoresin kaya akan likopen dengan potensi nutraceutical yang tinggi.

Telah dilaporkan bahwa perawatan termal dapat mengurangi kapasitas antioksidan sayuran, seperti pada tomat, sementara tinggi perawatan tekanan hidrostatik dapat menjaga larut dalam air kapasitas antioksidan pure tomat. Dalam tomat, dipaksa mengudara pada suhu 42 ° C selama 48 jam mengurangi asam askorbat, fenolat total dan aktivitas antioksidan total, tetapi meningkatkan kandungan likopen yang dapat diekstraksi. Pemrosesan tomat khas rumah menyebabkan hilangnya beberapafat antioksidan dan perubahan warna. Telah di laporkan bahwa merebus dan memanggang memiliki efek yang relatif kecil pada asam askorbat, fenolat total, likopen dan aktivitas antioksidan total, saat menggoreng secara signifikan mengurangi nutrisi penting ini.

Lada adalah sumber nutrisi penting dalam makanan, dan sumber vitamin A, C dan E, serta antioksidan fenolik. Dua fraksi fenolik, flavonoid (dengan asam fenolik) dan capsaicinoids yang diisolasi dari pericarp buah lada menunjukkan aktivitas antioksidan. Masa panen

dan panen mempengaruhi antioksidan dan pengembangan proses oksidatif dalam paprika. Masing-masing manis kultivar lada yang diteliti menunjukkan perbedaan dalam senyawa antioksidan, tergantung pada periode panen, tetapi Mei adalah waktu yang optimal, jika semua kultivar harus dipanen pada saat yang sama. Nilai gizi cabai sangat ditentukan oleh askorbat kandungan asam. Sebuah penelitian mengungkapkan bahwa kandungan asam askorbat berangsur-angsur meningkat dari hijau menjadi merah, dan kemudian menurun di kemudian hari tahap (merah sebagian kering dan merah buah kering sepenuhnya). Variabilitas kadar asam askorbat dalam genotipe menunjukkan bahwa ini dipilih genotipe dapat bermanfaat sebagai orang tua dalam program hibridisasi, untuk menghasilkan buah-buahan dengan nilai gizi yang baik. Asam askorbat kandungan lada manis juga meningkat seiring pematangan buah, sementara berkurang selama penanganan pasca panen.

### **3.1 Antioksidan dalam sayur-sayuran**

Wortel kaya serat, karoten, vitamin C dan E, dan fenolat seperti asam coumaric, klorogenik dan caffeic. Antosianin yang larut dalam air yang diperoleh dari wortel juga memiliki sifat antioksidan. Minum jus wortel dapat melindungi sistem kardiovaskular dengan meningkatkan status antioksidan total, dan dengan mengurangi peroksidasi lipid. Antioksidan yang larut dalam air kapasitas jus wortel dapat ditingkatkan dengan perlakuan termal dan dikelola oleh perawatan tekanan tinggi. Selain itu, tanaman umbi seperti bawang dan bawang putih mengandung antioksidan yang menyediakan unsur nutrisi tambahan di daerah di mana makanan seperti itu sering dikonsumsi,

seperti Eropa Timur, wilayah Mediterania, dan di bagian dunia barat. Di antara sayuran mentah yang sering dikonsumsi, level tertinggi dari aktivitas antioksidan ditemukan dalam bawang merah, diikuti oleh bawang putih = bawang kuning > bawang putih, dalam urutan itu.

Sayuran kelompok Brassica kaya akan polifenol, flavonoid dan glukosinolat. Senyawa-senyawa produk hidrolisis tersebut memiliki karakter unggul antara lain antibakteri, antioksidan dan sifat antikanker. Sayuran brassica menyediakan kelompok besar glukosinolat, yang menurut Plumb et al. (1996) lebih suka memiliki aktivitas antioksidan rendah, tetapi produk hidrolisisnya dapat melindungi terhadap kanker. Secara umum, di antara sayuran Brassica, kol putih memiliki kandungan vitamin C yang paling rendah. Warna merah pada kol merah disebabkan oleh adanya anthocyanin, yaitu senyawa yang termasuk dalam flavonoid. Kandungan total senyawa karotenoid pada kubis Brussel, brokoli, kol merah dan kol putih secara berturut-turut adalah 6.1, 1.6, 0.43 dan 0.26 mg / 100 g. Lutein dan  $\beta$ -karoten adalah karotenoid yang dominan di dalam Brassica. Beberapa jenis sayuran Brassica juga mengandung cryptoxanthin, neoxanthin dan violaxanthin. Menurut Heinonen et al. (1989) senyawa Cryptoxanthin hanya ada dalam brokoli (0,024 mg / 100 g). Sedangkan Pironen et al. (1986) menyebutkan urutan total tokoferol dan tokotrienol dari sayuran Brassica dari yang paling tinggi hingga paling rendah adalah sebagai berikut: brokoli (0,82 mg / 100 g) > kubis Brussel (0,40 mg / 100 g) > kembang kol (0,35 mg / 100 g) > kol cina (0,24 mg / 100 g) > kubis merah (0,05 mg / 100 g) > kubis putih (0,04 mg / 100 g)

Brokoli dapat dibedakan dari sayuran Brassica lainnya karena banyaknya zat bioaktif yang meningkatkan kesehatan. Diantaranya bioaktif senyawa, glukosinolat, fenolik, vitamin C, B1, E, karotenoid dan selenium patut mendapat perhatian khusus. Keuntungan tambahan dari brokoli adalah kecenderungannya untuk mengakumulasi logam berat. Kuntum brokoli dicirikan oleh kandungan glukoraphanin yang sangat tinggi (17,95  $\mu\text{mol} / \text{g}$  berat kering), yang terdiri dari sekitar 50% dari total glukosinolat [48]. Di antara berbagai spesies sayuran, brokoli membedakan dirinya dengan konsentrasi polifenol yang tinggi, lebih dari tiga kali lipat lebih tinggi dari kentang atau selada [49,50]. Tingkat tinggi asam askorbat dalam brokoli segar [51], serta komposisi senyawa fenolik, menguntungkan untuk netralisasi radikal bebas. Perkembangan kepala brokoli disertai dengan hilangnya klorofil dan asam askorbat. Pada tahap pra-florescence akumulasi larut fenolik diamati [52]. Brokoli berkecambah berwarna ungu mengandung jumlah senyawa antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan hijau brokoli, tetapi cenderung menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi terhadap perawatan memasak. Metode memasak harus dipertimbangkan dengan cermat dalam diet saat ini rekomendasi. Komponen antioksidan dari brokoli yang dimasak adalah sangat berbeda dari brokoli mentah. Kandungan antioksidan dari brokoli dipertahankan atau ditingkatkan lebih banyak setelah microwave, daripada sesudahnya mendidih. Memasak dalam air menyebabkan efek pencucian antioksidan, dan ini meningkat dengan durasi memasak.

Selada memiliki antioksidan yang efektif dan mempromosikan kesehatan lainnya properti. Di antara berbagai jenis selada yang

umumnya ditanam, leaf type paling banyak ditemukan dalam phytochemical yang meningkatkan kesehatan [56].

Selada kultivar 'Sails Merah', yang memiliki dedaunan merah longgar, umumnya lebih tinggi dalam konsentrasi fenolik total dan kapasitas antioksidan. 'Merah Sails' juga mengandung jumlah senyawa fenolik utama yang lebih tinggi, asam klorogenik [57]. Genotipe seiring dengan pertumbuhan dan kondisi manajemen, bias mempengaruhi kandungan dan komposisi antioksidan pada tanaman.

Kondisi pertumbuhan secara signifikan mempengaruhi kandungan banyak fenolik senyawa dalam selada. Tumbuh selada di bawah bidang terbuka memiliki positif berdampak pada kualitas yang meningkatkan kesehatan, dibandingkan dengan budidaya di terowongan tinggi [57].

Bayam dan kangkung juga kaya akan sumber karoten dan polifenol. Bayam memiliki polifenol total yang sangat tinggi dan konten flavonoid. Tingginya kadar asam polifenol dan flavonoid dalam daun bayam mempengaruhi aktivitas antioksidan yang tinggi. Bayam dan kale juga mengandung lutein, yang dikenal karena aktivitas antioksidannya. Konsentrasi lutein diukur 0,43 hingga 0,88 mg / g untuk beku bayam, dan 0,83 mg / g untuk bayam segar [58].

Sifat antioksidan kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) dan Kacang ubi Afrika (*Sphenostylis sternocarpa*) dinilai dengan berkaitan dengan Vitamin C mereka, total fenol dan konten fitat, juga sebagai aktivitas antioksidan, seperti yang ditunjukkan oleh kekuatannya yang berkurang dan bebas kemampuan memulung radikal. Hasil (Tabel 1)

menunjukkan bahwa Cowpea dan bengkuang Afrika dapat dianggap sebagai makanan fungsional karena untuk aktivitas antioksidan mereka yang relatif lebih tinggi (pembersihan radikal bebas kemampuan dan potensi redoks), yang disebabkan oleh konten fenol total [60].

**BAB – 4**

**SUMBER ANTIOKSIDAN ALAMI  
HEWANI**



Antioksidan enzimatis merupakan antioksidan *in vitro* yang dapat ditemukan pada tubuh hewan. Antioksidan enzimatis berfungsi untuk menangkal radikal bebas. Berbeda dengan jenis antioksidan yang lain, pengukuran aktivitas antioksidan enzimatis didasarkan pada jenis enzim tersebut. Hal ini disebabkan karena perbedaan jenis antioksidan enzimatis, memiliki cara menangkal radikal bebas yang berbeda pula.

Pada masing-masing sampel, *Lobiger serradifalci*; *Oxyanae olivacea*; dan *Ruditapes decussatus*, pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada enzim katalase (CAT), *Superoxide dismutase* (SOD), GSH (*Glutathione peroxidase*). SOD merupakan metaloenzim yang berfungsi sebagai katalase proses dismutase anion superoksida menjadi hidrogen peroksida. Katalase (CAT) merupakan enzim yang berfungsi dalam mengurangi dan mengubah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> menjadi air. Selanjutnya enzim GSH memiliki fungsi detoksifikasi peroksida dalam sel. Terakhir, mekanisme pengujian menggunakan LPO berfungsi untuk mengetahui aktivitas antioksidan enzimatis dalam mencegah proses peroksidasi pada lemak, sekaligus sebagai *oxidative stress marker* (Cavas et al., 2005; Geret et al., 2002).

Masyarakat tradisional mempercayai bahwa Moluska bermanfaat pada dunia pengobatan. Baik dari bagian tubuh mana pun, mulai dari daging hingga bagian cangkang. Hal ini disebabkan karena pada moluska memiliki berbagai jenis komponen aktif mulai dari karbohidrat, mineral, lemak, sterol, nukleotida dan banyak lagi (Khan & Liu, 2019). Pada sejumlah komponen tersebut, antioksidan menjadi salah satunya. Beberapa pengujian menemukan potensi aktivitas antioksidan pada Moluska. Salah satunya adalah pengujian yang telah dilakukan,

ditemukan bahwa organisme laut jenis moluska memiliki kemampuan antioksidan. Hal itu dibuktikan dengan penelitian (Vershinin, 1996) dan artikel review dari (X. Wang et al., 2017) ditemukan kandungan antioksidan dalam bentuk karotenoid dan ikatan peptida pada organisme laut terutama moluska. Tidak hanya Moluska laut saja, pada beberapa penelitian juga menunjukkan adanya aktivitas antioksidan pada jenis moluska air tawar dan darat. Berikut adalah jenis Moluska baik air tawar, darat ataupun laut, beserta dengan hasil pengujian antioksidan

| Jenis Antioksidan                           | Moluska   | Asal Moluska      | Aktivitas Tertinggi (IC50)   | Referensi                         |
|---|---|-------------------|--|-----------------------------------|
| Flavonoid dan Alkaloid                      | Kerang Pisau ( <i>Solen spp.</i> )              | Moluska Air Laut  | DPPH: 2008,52 ppm  | (Nurjanah et al., 2011)           |
| Biopeptida (Trp-Pro-Pro)                    | <i>Tegillarca granosa</i> (blood clam)          | Moluska Air Laut  | DPPH: 1,388 mg/ml<br>HO: 0,406 mg/ml<br>O <sub>2</sub> : 0,536 mg/ml<br>ABTS: 2,75 mg/ml | (Chi, Hu, Wang, Li, & Ding, 2015) |
| Biopeptida (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys)            | <i>Saccostrea culculata</i> (oyster)            | Moluska Air Laut  | DPPH: 83.79 ± 0,53 %   | (Umayaparvathi et al., 2014)      |
| L-DOPA, dopamine, taurine, melanine         | <i>Sepia officinalis</i> (cuttlefish ink)       | Moluska Air Laut  | DPPH: 83,06%<br>TBAR: 176,77   | (Fahmy, 2014)                     |
| Taurine, GSH (glycine, glutamine, cysteine) | <i>Coelatura aegyptiaca</i> (freshwater mussel) | Moluska Air Tawar | DPPH: 73,14%<br>TBAR: 177,23   | (Fahmy, 2014)                     |

ikatan peptide hasil ekstraksi jaringan dari Moluska, baik Moluska air laut ataupun Moluska air tawar dan darat. Pada hasil ekstraksi bagian keseluruhan jaringan, didapatkan bahwa dengan berat molekul yang lebih kecil akan mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar. Terlihat pada contoh sampel seperti *Tegillarca granosa*, dimana didapatkan dua sumber antioksidan yang memiliki berat molekul berbeda, dan aktivitas tertinggi didapat pada BCP-A dengan berat molekul paling kecil dibandingkan dengan BCP-B. seperti diketahui sebagai penyusun peptida dengan yang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Terlihat dari pengujian DPPH, ABTS dan *hydroxyl*

*radical scavenging*, hasil  $IC_{50}$  menunjukkan nilai yang lebih sedikit, 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  $IC_{50}$  yang lebih kecil dengan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi pada pengujian *hydroxyl radical scavenging*. Sayangnya, kedua sampel tidak menunjukkan aktivitas antioksidan dalam pengujian FRAP (Mendis et al., 2005). Hal yang sama ditunjukkan juga pada sampel *Saccostrea culiculata*, pada pengujian DPPH menunjukkan persentase aktivitas yang lebih tinggi pada SCAP1 lebih rendah berat molekulnya, dibandingkan 2 sampel lain dengan jenis organisme yang sama, sebesar 515,29 Da (Umayaparvathi et al., 2014). Berat molekul yang berbeda pada peptide, mengakibatkan perbedaan aktivitas, dapat disebabkan berdasarkan panjang pendeknya ikatan yang menyusun serta molekul penyusunnya.

Pada pengujian yang dilakukan Umayaparvathi *et al.* (2014), mengemukakan bahwa pada studi sebelumnya, peptide dengan berat molekul tertentu memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda pula. Hal ini juga menunjukkan bahwa peptide dengan berat molekul lebih rendah, terdiri dari 5-16 asam amino penyusun, dapat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. Pada sampel *Ruditapes*, dengan berat molekul yang rendah memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Semakin pendek ikatan peptide memiliki aktivitas biologis yang lebih besar daripada satu ikatan besar protein (Li et al., 2015). Sesuai dengan hasil pengujian pada *Saccostrea culiculata*, bahwa peptide dengan berat molekul terendah, SCAP 1, memiliki aktivitas antioksidan

tertinggi. Didukung oleh teori Moosmann and Behl (2002) dalam Zhouyong *et al.* (2017) bahwa semakin kecil ukuran ikatan peptide, maka memiliki kemampuan aksesibilitas dalam sistem antioksidan yang lebih baik daripada protein dan ikatan peptide yang lebih besar. Sama halnya dengan sampel berupa ekstrak peptide pada *Dosidicus gigas* dan *Lamellibranchia*, yaitu ikatan peptide dengan berat molekul terendah memiliki aktivitas tertinggi. Terutama pada sampel *Lamellibranchia*, bahwa ikatan peptide hasil fraksinasi memiliki kemampuan aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan ikatan peptide yang tidak terfraksinasi. Terlihat pula pada sampel ekstrak kasar tanpa proses fraksinasi lebih lanjut. Hal ini menunjukkan bahwa berat molekul protein yang mengalami fraksinasi akan semakin kecil ukurannya, dan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik, sekaligus memudahkan dalam meneliti asam amino penyusun ikatan peptide (Borquaye *et al.*, 2015; Mendis *et al.*, 2005; Zhouyong *et al.*, 2017). Panjangnya ikatan peptide dan berat molekul berkaitan dengan perkembangan studi, dimana dengan berat molekul 500–1400 Da dan terdiri 2–20 asam amino penyusun, peptide memiliki aktivitas antioksidan (Li *et al.*, 2015; Umayaparvathi *et al.*, 2014).

Pengaruh berat molekul pada matriks biopeptide berkaitan erat dengan asam amino penyusun rantai tersebut. Selain berat molekul pada ikatan peptide, yang mempengaruhi dalam aktivitas antioksidan adalah pada matriks penyusun ikatan peptide, yaitu asam amino. Beberapa jenis asam amino seperti Tyr, Met, Pro, Lys, His, Cys, Gly, dan Trp diketahui memiliki aktivitas antioksidan, dengan Tyr, Met, Pro, dan Trp berinteraksi dengan asam lemak, meningkatkan solubilitas peptide pada lemak. Meningkatkan proteksi dalam mencegah oksidasi.

Sedangkan pada asam amino hidrofobik seperti Trp dan Pro pada sampel BCP-A dapat meningkatkan interaksi antara peptide dengan asam lemak dan secara signifikan meningkatkan periode induksi pada *linoleic acid antioxidant* (Chi et al., 2015; Li et al., 2015; Umayaparvathi et al., 2014). Pada asam amino larut lemak atau hidrofobik (alanin, valin, isoleusin, leusin, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, proline, methionine, dan cysteine), meningkatnya hidrofobisitas dapat meningkatkan kemampuan aktivitas antioksidan dan emulsifikasi. Selain itu peptide memiliki efek sinergis dengan komponen antioksidan lain yang memiliki sifat dan kelarutan yang sama, seperti pada  $\alpha$ -tocopherol (Mendis et al., 2005). Salah satu jenis asam amino lain yang memiliki aktivitas antioksidan adalah His. Asam amino ini memiliki kemampuan untuk donasi proton dari gugus midazole. Proline juga memainkan peranan penting dalam aktivitas antioksidan pada ikatan peptide, dimana ikatan Pro-His-His menunjukkan aktivitas antioksidan. Sedangkan Trp, sebagai asam amino aromatik, memiliki aktivitas antioksidan karena adanya cincin indole yang berfungsi sebagai donor hidrogen. Kemudian pada asam amino Cys, aktivitas antioksidan disebabkan karena adanya gugus SH yang berfungsi pula sebagai donor hidrogen. Jika Cys dan Trp berada pada satu rantai peptide yang sama, akan berkontribusi secara signifikan pada aktivitas antioksidan (Umayaparvathi et al., 2014; Zhouyong et al., 2017; Zou, He, Li, Tang, & Xia, 2016).

Tidak hanya pada keseluruhan jaringan, pada filum Cephalopoda, tinta sebagai bagian dari pertahanan diri juga diketahui memiliki fungsi sebagai bioaktif yang dapat membunuh sel kanker, meningkatkan jumlah leukosit dan produksi tromboksin, serta antivirus, Aktivitas

antioksidan juga sebagai salah satu fungsi bioaktif pada tinta Cephalopoda yang disebabkan karena adanya ikatan protein sebagai 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), taurine (Fahmy, 2014). Hal ini didukung juga dengan penelitian ekstrak kasar protein pada sampel tinta *Loligo formosana* tanpa melanin, menunjukkan adanya aktivitas antioksidan pada kandungan protein tinta cumi tersebut (Vate & Benjakul, 2013). L-DOPA merupakan protein yang diketahui sebagai bagian dari pengobatan penyakit Parkinson, dan memiliki manfaat, salah satunya adalah mencegah terbentuknya radikal bebas yang mengakibatkan terbentuknya Parkinson. L-DOPA juga merupakan prekursor dari Dopamine. Sedangkan Dopamine adalah Katekolamin, dopamin (DA), memainkan peran utama dalam kontrol motorik, kognitif, perilaku dan fungsi endokrin dalam sistem saraf pusat (SSP). Baik L-DOPA ataupun Dopamine memiliki efek terhadap kondisi fisiologis dan memiliki kemampuan untuk donor hidrogen pada gugus hidroksil (Dorszewska, Prendecki, Lianeri, & Kozubski, 2014; Fahmy, 2014; Pellicano, E. Pontieri, Fanciulli, & R. Buttarelli, 2011; Vate & Benjakul, 2013). Sedangkan Taurine adalah asam amino yang mengandung sulfur, yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Fahmy, 2014). Selain itu, berat molekul juga mempengaruhi aktivitas antioksidan, terlihat pada sampel <3kDa pada *Loligo formosana*. Berat molekul tersebut memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi daripada hasil fraksinasi lain yang memiliki berat molekul berbeda (Vate & Benjakul, 2013).

Pada proses preparasi, semua sampel, kecuali sampel berupa tinta, dilakukan proses ekstraksi dan hidrolisis untuk mendapatkan biopeptida yang akan diujikan juga, mempengaruhi proses pengujian antioksidan. Derajat hidrolisis (DH) pada saat preparasi, mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pada sampel gelatin pada kulit *Dosidicus gigas* dengan penggunaan beberapa jenis enzim, trypsin memiliki DH yang lebih besar dibandingkan dengan jenis enzim lainnya. Hal ini disebabkan karena hasil hidrolisis menggunakan trypsin memiliki ikatan peptide yang lebih pendek. DH juga berhubungan dengan berat molekul ikatan peptide, ketika ikatan peptide menjadi lebih pendek maka berat molekul juga akan lebih sedikit (Mendis et al., 2005). Sedangkan untuk sampel berbentuk tinta pada filum Cephalopoda, sampel tidak mengalami proses ekstraksi dan hanya dilakukan identifikasi molekul penyusun baik pada sampel *Loligo formosana* ataupun *Sepia officinalis*. Hal ini dapat disebabkan karena penyusun dari tinta sendiri kompleks terdiri dari melanin, peptidoglikan, asam-asam amino, metal, dan toksin. Diketahui senyawa penyusun tersebut memiliki aktivitas antioksidan dan sudah teridentifikasi

polisakarida sebagai hasil ekstraksi jaringan dari Moluska, baik Moluska air laut ataupun Moluska air tawar dan darat. Pada hasil ekstraksi bagian keseluruhan jaringan, didapatkan bahwa dengan berat molekul yang lebih kecil akan mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih besar. Terlihat pada contoh sampel *Corbicula fluminea*, dimana didapatkan dua sumber antioksidan yang memiliki berat molekul berbeda berasal dari dua metode ekstraksi yang berbeda, dan aktivitas tertinggi didapatkan pada CFPS (*Corbicula fluminea* Polysaccharide



Sulfate) dengan menggunakan metode Ultrasonic assisted enzymatic extraction. Dengan pengujian menggunakan 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. UAEE (Ultrasonic assisted enzymatic extraction) merupakan metode yang memiliki efek sinergis antara enzim dengan ultrasound pada bagian permukaan sel yang meningkatkan permeabilitas sel dan menghasilkan lebih banyak polisakarida. Polisakarida yang dihasilkan, semakin tinggi hasil ekstraksi, maka akan semakin tinggi proporsi polisakarida yang terlarut dalam media cair. Selain itu, kemampuan ekstraksi pada UAEE mampu me-depolimerisasi komponen menjadi fragmen dengan berat molekul yang semakin rendah (Liao et al., 2015). Hal ini juga terlihat pada sampel *Dendrobium*, dimana hasil fraksinasi dengan berat molekul terendah memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan 11,4 kDa (Luo et al., 2010). Didukung oleh teori J. Wang, Hu, Nie, Yu, & Xie (2016), bahwa salah satu faktor penting yang mempengaruhi aktivitas antioksidan pada polisakarida adalah berat molekul. Ketika berat molekul lebih rendah, maka akan lebih banyak mengurangi atau menerima radikal bebas, sehingga dapat mencapai titik stabil.

Selain berat molekul, monosakarida atau disakarida penyusun polisakarida juga mempengaruhi aktivitas antioksidan. Pada sampel *Corbicula fluminea*, pada dua sampel hasil ekstraksi secara enzimatik dan ultrasonik. Pada kedua sampel tersebut, struktur penyusun, tidak mengandung *reducing sugar*, terdiri dari fucose, arabinose, mannose, glucose, galactose, glucuronic acid, dan sulfonic acid (Liao et al.,

2015). Pada sampel *Ginkgo biloba*, ditemukan dua jenis polisakarida. Pada polisakarida netral, molekul penyusun aktivitas antioksidan adalah rhamnose, arabinose, mannose, glucose, dan galactose. Sedangkan pada polisakarida yang memiliki pH asam, tersusun atas mannose, rhamnose, glucuronic acid, galacturonic acid, galactosamine, glucose, galactose, xylose, arabinose, and fucose (Chen, Zhang, Jiang, Mu, & Miao, 2012). Hal ini juga didukung pada penelitian dengan sampel *Dendrobium nobile* Lindl, bahwa sampel dengan kandungan rhamnose yang cukup tinggi, memiliki aktivitas antioksidan paling besar (Luo et al., 2010).

Pada sampel selanjutnya, *hyaluronic acid* (HA) pada *Amussium pleuronectus*, menunjukkan aktivitas antioksidan baik pada DPPH, *hydrogen radical scavenging*, dan ABTS. *Hyaluronic acid* sebagai turunan GAG terbentuk atas rantai disakarida berulang terdiri dari N-asetil-D-glukosamin dan D-glucuronic acid yang berikatan glikosidik pada  $\beta$  (1,4) dan  $\beta$  (1,3), dengan berat molekul berkisar pada 104-107 Da. Peran HA sebagai aktivator dan modulasi dari respon peradangan, juga berperan dalam mencegah aktivitas ROS dalam tubuh seperti radikal hidroksil ( $\bullet$ OH). (Liao et al., 2015).

Sampel terakhir yang berkaitan dengan polisakarida adalah chitosan pada Chiton yang dibandingkan dengan chitosan komersial. Chitosan sendiri merupakan turunan dari chitin yang sudah mengalami proses deasetilasi. Saat dibandingkan dengan chitosan komersial, chitosan yang berasal dari chiton memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi ditunjukkan pada pengujian DPPH dan ABTS dengan 125  $\mu$ g/ml (75% at 1000  $\mu$ g/ml) dan 250  $\mu$ g/ml (73% at 1000  $\mu$ g/ml). Chitosan

merupakan rantai linier polisakarida terdiri atas ikatan (1-4) pada monomer 2-amino-2-deoxy-b-D-glucoopyranose. Dalam pembentukan chitosan sendiri, proses deasetilasi chitin menggunakan media basa kuat. Ketika nilai deasetilasi (DDA) akan meningkat hingga lebih dari 90%, chitosan dapat semakin terlarut pada asam (Rasti et al., 2017).

Sama seperti biopeptida, proses pengekstrasian juga mempengaruhi dalam aktivitas antioksidan. Pada sampel *Corbicula fluminea* dan *Amassium pleuronectus*, digunakan enzim papain dalam proses pengekstrasian. Pada proses pengekstrasian polisakarida, terutama pada sampel yang berasal dari hewan dengan kandungan protein yang tinggi, biasanya cukup sulit untuk menganalisa komposisi polisakarida yang terkandung. Maka diperlukan teknologi, salah satunya proses enzimatik untuk proses deproteinasi pada polisakarida. Papain adalah salah satu enzim thiol protease biasa digunakan untuk proses preparasi polisakarida yang digunakan (Kanchana et al., 2013; Liu et al., 2012). Sedangkan untuk sampel chitosan, menggunakan proses deproteinasi dengan menggunakan NaOH untuk memecah ikatan ester antara asam amino dengan chitin (Percot, Viton, & Domard, 2003; Rasti et al., 2017).

dalam Moluska tidak hanya ditemukan aktivitas antioksidan berupa protein dan polisakarida saja, tetapi juga terdapat beberapa komponen lain seperti flavonoid, alkaloid, dan polifenol. Pada sampel menggunakan *black mussel*, pada metode untuk menghitung total senyawa polifenol dengan beberapa jenis *solvent* dan suhu yang berbeda. Polifenol sendiri merupakan komponen yang terdiri dari beberapa

kelas seperti flavonol, isoflavones, dan masih banyak lagi. Polifenol berasal dari hasil metabolisme sekunder dari pentosephosphate, shikimate, dan phenylpropanoid pada tumbuhan. Adanya senyawa polifenol dalam *black mussel* dapat berperan dalam mencegah penyakit degenerative, sebagai anti-allergenic, antimicrobial, antioxidant, dan anti-inflammatory. Adanya senyawa polifenol dalam tubuh dapat disebabkan karena sumber makanan yang diasup mengandung senyawa tersebut (Gorinstein et al., 2003; Parada & Aguilera, 2007). Hal ini juga berlaku pada sampel kerang pisau, yang ditemukan adanya senyawa flavonoid dan alkaloid pada sampel dengan ekstraksi menggunakan pelarut kloroform atau pelarut polar. Berdasarkan penelitian sebelumnya, Riguera (1997) menyatakan bahwa komponen polar yang terdapat pada invertebrata laut didominasi oleh garam-garam alkaloid, asam amino, polihidrosteroid dan saponin. Sedangkan, hasil ekstraksi 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). Alkaloid dan flavonoid sendiri merupakan jenis senyawa polifenol yang mampu berfungsi sebagai antioksidan dalam tubuh (Parada & Aguilera, 2007).

Pada sampel kerang pisau, menggunakan pengujian DPPH, didapatkan aktivitas antioksidan tertinggi dengan pelarut kloroform sebesar 2008,52 ppm. Selanjutnya pada sampel *black mussel* dengan menggunakan pengujian ABTS didapatkan nilai sebesar  $0,65 \pm 0,06$ .



Penggunaan DPPH pada pengujian alkaloid dan flavonoid pada sampel kerang pisau,



## **BAB – 5**

# **SUMBER ANTIOKSIDAN NON ALAMI (SINTETIS)**

### 5.1. Antioksidan untuk lemak dan minyak

Antioksidan terbagi menjadi antioksidan sintetis dan alami. Aplikasi antioksidan terbesar ditemukan dalam pengolahan biji minyak menjadi minyak dan lemak di mana penyulingan menghilangkan kotoran dari minyak nabati. Dengan ini Kotoran antioksidan alami juga bisa dihilangkan dari minyak, menjadikannya produk yang rentan terhadap oksidasi. Berbagai antioksidan sintetis tersedia untuk mengembalikan atau bahkan meningkatkan perlindungan minyak alami terhadap degradasi oksidatif dan dengan demikian meningkatkan umur simpan mereka secara signifikan. Penggunaan antioksidan lain ditemukan dalam rendering lemak hewani, daging industri, dalam makanan yang dipanggang dan hampir semua makanan dengan kandungan minyak tinggi seperti mayones dan margarin.

BHA Butylated hydroxyanisole (E-320) mungkin merupakan antioksidan yang paling banyak digunakan dalam industri makanan. BHA dapat dengan mudah diaplikasikan pada makanan karena sangat baik kelarutannya dalam lemak dan minyak. Ini panas stabil dan dari semua antioksidan itu memiliki yang terbaik efek bawaan ke dalam makanan yang dipanggang, memberikan umur simpan yang panjang. Namun antioksidan sintetis seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), and *propyl gallate* terbukti dapat meningkatkan risiko karsinogenik, maka antioksidan alami dari buah, sayur, buah, dan lain-lain lebih digunakan (Brewer, 2011).

Proses oksidasi sendiri dapat menyebabkan off-flavour dan off-odor karena reaksi lemak dengan O<sub>2</sub>, peroksida, dan hidroperoksida menghasilkan senyawa karbonil. Oksidasi sendiri dapat dipicu karena panas, cahaya, ion metal, dan kelembaban (Embuscado, 2015; Suhaj, 2006). Antioksidan yang efisien dalam mencegah dan menghambat proses oksidasi, akan memproduksi radikal bebas FRS- yang tidak bereaksi terlalu cepat dengan O<sub>2</sub> untuk pembentukan peroksida. Antioksidan sendiri dipengaruhi oleh pH, volatilitas dan polaritas larutan konsentrasi, dan pada antioksidan yang terdapat pada polisakarida dipengaruhi juga oleh ikatan glukosida serta komposisi monosakarida (Karadag et al., 2009). Namun, jumlah antioksidan yang terlalu banyak dapat berubah menjadi prooksidan dan memicu proses oksidasi (Nurjanah, Izzati, & Abdullah, 2011).

BHT Butylated hydroxytoluene (E-321) adalah analog sintetis vitamin E seperti BHA dan beroperasi dengan mengurangi radikal oksigen dan mengganggu penyebaran oksidasi proses. Volatilitasnya pada suhu yang lebih tinggi membuatnya sangat cocok untuk produk yang disimpan pada suhu sedang. BHT sebagai kristal halus, paket kecil dan larutan minyak cair (dengan atau tanpa BHA sinergis). Aplikasi termasuk: lemak hewani, permen karet, hewan pakan, minyak sayur.

TBHQ Tert-butylhydroquinone (E-319) adalah antioksidan untuk keperluan umum yang banyak digunakan aplikasi. Kekuatannya meningkat dengan tingkat ketidakjenuhan yang lebih tinggi, membuatnya banyak digunakan dalam minyak nabati. Aplikasi lain adalah margarin, minyak ikan, makanan yang digoreng, minyak esensial, kacang-kacangan, lemak hewani yang dapat dimakan, lemak

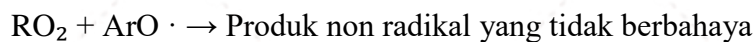
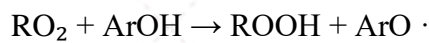


mentega dan makanan goreng kemasan. TBHQ sebagai bubuk dan larutan cair dengan atau tanpa ditambahkan sinergis untuk meningkatkan kemampuan antioksidan. Propyl gallate Propyl gallate (E-311) terbuat dari asam galat alami dan menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat baik dalam makanan dan minyak nabati, terutama dalam kombinasi dengan ascorbyl palmitat. Ini juga sinergis dengan BHA. Propyl gallate menunjukkan kelarutan yang lebih rendah di minyak dibandingkan dengan BHA dan BHT. Propyl gallate sebagai bubuk dan sebagai larutan cair (dengan atau tanpa antioksidan sinergis lainnya dan asam sitrat).

## **5.2. Aspek keamanan pangan antioksidan sintetis**

Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), tert-butyl hydroquinone (TBHQ) adalah antioksidan sintetis yang sering digunakan dalam makanan, sedangkan, alami antioksidan yang umumnya ditambahkan dalam makanan adalah tokoferol, asam askorbat, dll efektif pada konsentrasi yang sangat rendah, dosis yang lebih tinggi dapat menghasilkan efek toksik. Sitotoksitas BHA dan BHT telah ditemukan dalam garis sel leukemia promyelocytic manusia (HL-60) dan sel karsinoma skuamosa baris [3]. Masalah keamanan pangan dengan antioksidan sintetis ini membatasi penggunaannya sebagai aditif. Di sisi lain Sebaliknya, biaya produksi lebih tinggi dan efisiensi antioksidan alami yang lebih rendah seperti askorbat asam, tokoferol dll telah memicu kebutuhan untuk mengeksplorasi sumber alami alternatif dan mungkin lebih aman antioksidan makanan. Pengolahan buah dan sayuran di India menghasilkan limbah dalam jumlah besar dan residu. Telah dilaporkan bahwa limbah ini dan

produk sampingan dari buah-buahan dan sayuran seperti biji, dikupas dan pomace adalah sumber antioksidan yang melimpah [4], tetapi ini belum digunakan secara konvensional. Aktivitas beberapa aditif antioksidan sintetik yang umum digunakan: BHA, BHT dan TBHQ banyak digunakan aditif antioksidan sintesis dalam makanan. Ini adalah senyawa fenolik. BHA dan BHT adalah cukup stabil terhadap panas dan sering digunakan untuk stabilisasi lemak pada produk yang dipanggang dan digoreng. Beberapa antioksidan, seperti BHA dan BHT, digunakan dalam kombinasi dengan efek sinergis yang dihasilkan [7]. BHA juga sinergis dengan propil galat [8]. Antioksidan ini bertindak sebagai agen pemutusan itu menekan oksidasi otomatis. Mereka menghentikan reaksi berantai dengan mekanisme berikut:



Dimana 'R' adalah gugus alkil atau aril, dan ArOH adalah BHA atau BHT.

Karakteristik oksidatif dan / atau metabolit BHA dan BHT sedang diselidiki karena adanya kontribusi yang mungkin untuk karsinogenisitas atau tumorigenisitas. Masalah keamanan pangan ini dengan sintesis ini antioksidan membatasi penggunaannya sebagai aditif.

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

## **BAB – 6**

# **ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN**

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

WPS Office

## 6.1. Metode-Metode Analisis Antioksidan

Uji analisis antioksidan merupakan pengukuran secara kuantitatif terhadap kemampuan suatu komponen sebagai reducing agent. 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 fluorescence yang merupakan suatu radikal bebas. Dimana 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 (ORACOH\*)

### 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 solvent 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)

#### 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 tanpa melibatkan perlakuan pre-treatment, karena dianggap konstan dan linear hasil dari pengujian tersebut. 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. 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. Selain itu, sama seperti metode pengujian lain, FRAP

menggunakan antioksidan lain yang sudah diketahui kemampuannya sebagai pembanding atau kombinasi interaksi antar keduanya. Contohnya adalah asam askorbat,  $\alpha$ -tocopherol, dan bilirubin. FRAP juga dianggap sebagai metode yang 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, 1999).

## ABTS

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. 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).

## Uji DPPH

Uji aktivitas antioksidan ini ditemukan oleh Blois (1995), dimana dalam pengujian menggunakan DPPH ( $\alpha, \alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl;  $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ,  $M=394.33$ ) yang merupakan radikal bebas yang bersifat stabil (Kedare&Sigh, 2011). Pada uji ini, DPPH akan bewarna 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 sendiri 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 IC50 (berasal dari inhibition concentration IC50 atau bisa dinyatakan sebagai efficiency concentration EC50), 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)

#### Hydroxyl Radical Activities (ORACOH\* atau HORAC)

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. Prinsip dari metode ini adalah ketika radikal bebas, yaitu azo-initiator ditambahkan molekul



berwarna atau fluorescent seperti  $\beta$ -phicoerythrin kemudian dipanaskan, azo-initiator akan menghasilkan radikal bebas peroksil yang merusak  $\beta$ -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, Sofic, & Prior, 1997).

## **6.2. Tinjauan Khusus: Pengaruh Ion Na<sup>+</sup> dalam Uji DPPH**

Metode analisis DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidazil) merupakan salah satu cara mengukur aktivitas antioksidan pada suatu bahan pangan. DPPH bertindak sebagai senyawa radikal bebas yang akan direaksikan dengan senyawa yang memiliki kandungan antioksidan (Vanselow, 2007 dalam Tristantini *et al.*, 2016). Cara kerja dari metode DPPH yaitu senyawa DPPH dalam larutan metanol yang bersifat radikal akan bertemu dengan bahan antioksidan yang akan memberikan atom hidrogen dan berkaitan dengan elektron bebas pada radikal DPPH.



$$\% \text{ Antioksidan} = \frac{A_c - A}{A_c} \times 100\%$$

Keterangan :

Ac= Nilai absorbansi kontrol

A= Nilai absorbansi sampel

Dari berbagai konsentrasi bahan didapatkan persamaan regresi yang digunakan untuk mendapatkan nilai IC50. IC50 merupakan nilai konsentrasi efektif yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat 50% oksidasi atau menurunkan 50% aktivitas DPPH (Proestos & Komaitis, 2009). Nilai IC50 (*efficient concentration*) berbanding terbalik dengan nilai kemampuan antioksidan dimana semakin rendah nilai IC50 menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu senyawa. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC50 kurang dari 50, kuat (50-100 ppm), sedang (100-150 ppm), dan lemah (151-200 ppm) (Badarinath, 2010 dalam Tristantini *et al.*, 2016).

Dalam pengukuran aktivitas antioksidan, dilakukan proses ekstraksi terlebih dahulu pada bahan pangan sumber antioksidan. Proses ekstraksi yang paling umum yaitu teknik maserasi dimana adanya proses perendaman bahan pangan dalam suatu larutan dalam waktu tertentu tanpa adanya pemanasan. Teknik maserasi paling umum digunakan dikarenakan mudah dilakukan dan tidak adanya penurunan senyawa antioksidan yang hilang diakibatkan dari panas yang diberikan (Rais, 2016). Pelarut seperti metanol, etil asetat, aseton, dan air digunakan dalam teknik ekstraksi bergantung dari sifat polaritas senyawa yang ingin diekstrak (Pecki *et al.*, 1998 dalam Thorat *et al.*, 2013). Selain dengan pelarut, terdapat metode ekstraksi lainnya yaitu

metode ultrasonik dimana ekstraksi dilakukan menggunakan *ultrasonik probe system* atau *ultrasonik Bath*. Dibandingkan dengan metode ekstraksi lainnya, metode ini memiliki teknik yang sederhana, cepat, dan lebih efektif (Thorat *et al.*, 2013). Hasil ekstraksi bergantung dari waktu ekstraksi dan jenis pelarut yang digunakan (Wijayanti *et al.*, 2016).

Penggunaan metode DPPH memiliki keunggulan bersifat sederhana dan mudah, namun dikarenakan penggunaan larutan organik maka terdapat kesulitan dalam menganalisis senyawa yang bersifat hidrofilik (Wulansari, 2018). Shalaby & Shanab (2013) mengatakan bahwa metode DPPH memiliki kelemahan dibandingkan dengan metode lain, di antaranya adalah dibutuhkan waktu reaksi yang cukup lama antara senyawa DPPH, kemudian kandungan pigmen antosianin pada bahan makanan dapat mengganggu dalam analisis kandungan antioksidan, dan senyawa DPPH diketahui bahwa sensitif terhadap pH asam. Selain itu, protein sebagai antioksidan tidak dapat diukur menggunakan metode DPPH, hal ini dikarenakan protein akan terendapkan di dalam medium alkoholik (Cömert & Gökmen, 2017). Senyawa DPPH merupakan senyawa radikal nitrogen stabil yang tidak memiliki kesamaan dengan senyawa radikal peroksil yang bersifat reaktif dan tidak stabil. Perbedaan sifat DPPH dengan radikal peroksil tersebut menyebabkan perbedaan reaksi terhadap antioksidan. Beberapa senyawa antioksidan yang dapat bereaksi dengan radikal peroksil secara cepat menghasilkan reaksi yang sangat lambat bahkan *inert* (tidak bereaksi) terhadap DPPH sehingga menghasilkan aktivitas antioksidan yang tidak akurat (Proestos & Komaitis, 2009).

Dalam proses pengolahan pangan, penambahan garam (NaCl) biasa dilakukan dengan tujuan pengawetan dan pemberian rasa. Namun pemberian garam dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dari suatu produk pangan. Perubahan aktivitas antioksidan tersebut bergantung dari konsentrasi garam dan proses pengolahan pangan yang dilakukan.

dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan pada produk bawang merah in brine, surimi dengan tepung ubi, daging babi, susu kedelai dengan penambahan polisakarida, dan tulang ikan salmon. Bawang merah in brine memiliki pH produk yang asam disebabkan oleh adanya penambahan asam sitrat selama proses pembuatan, sedangkan produk pangan lainnya memiliki pH netral ( $\pm 7$ ). Pengukuran aktivitas antioksidan digunakan beberapa metode yaitu DPPH, 2-DCPIP, dan pengukuran malonaldehid (MDA). Perlakuan penambahan garam pada produk pangan menghasilkan penurunan aktivitas antioksidan pada produk bawang merah in brine, daging babi, ekstrak tulang ikan salmon, dan surimi dengan tepung ubi. Sedangkan susu kedelai dengan penambahan polisakarida, penambahan garam mampu meningkatkan aktivitas antioksidan namun tidak secara signifikan.

Produk bawang merah in brine merupakan suatu inovasi olahan pangan peningkatan umur simpan yang terdiri dari bawang merah kupas dalam rendaman suatu cairan dengan formula NaCl dan asam sitrat yang kemudian dipanaskan dan disimpan dalam suatu wadah. Fungsi penambahan NaCl atau garam dapur berguna untuk menurunkan air bebas, mempengaruhi rasa, meningkatkan aroma, mouthfeel, lubricate, volatil, dan parameter sensori lainnya (Hoppu et

al., 2017 dalam Risfaheri et al., 2018). Sedangkan penambahan asam sitrat berguna untuk mencegah pencokelatan dan mempertahankan vitamin C serta antosianin (Abd-Elhady, 2014 dalam Risfaheri et al., 2018). Pada perlakuan yang sama, peningkatan konsentrasi garam menghasilkan penurunan aktivitas antioksidan yang tidak signifikan (peningkatan nilai IC50). Penurunan antioksidan lebih dikarenakan adanya penambahan asam sitrat (Risfaheri et al., 2018). Hal tersebut juga terjadi pada produk daging babi, ekstrak tulang ikan salmon, dan surimi dengan tepung ubi.

Pada daging babi, senyawa antioksidan direpresentasikan sebagai antioksidan enzimatis yang terdiri dari superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase, dan lain-lain yang memiliki peran dalam perlindungan alami daging (Hernandez et al., 2006 dalam Tunieva & Kotenkova, 2017). Enzim katalase akan mempercepat dekomposisi senyawa hidrogen peroksida dengan membentuk air dan oksigen. Enzim superoksida dismutase akan melakukan inisiasi perubahan superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Sedangkan enzim glutathion peroksidase akan mempercepat pemulihan peroksida yang disebabkan oleh tripeptida glutathion (Makhanova, 2011 dalam Tunieva & Kotenkova, 2017). Adanya proses pengolahan dan penambahan komponen-komponen lain seperti garam (NaCl) dapat mempengaruhi total antioksidan di dalam daging (Min et al., 2010 dalam Tunieva & Kotenkova, 2017). Dalam penelitian Tunieva & Kotenkova (2017) digunakan daging babi yang telah diberi garam selama 24 jam dan dilakukan pemanasan pada suhu 72 °C. Penambahan garam (NaCl) yang semakin meningkat menunjukkan

penurunan aktivitas antioksidan yang ditunjukkan dengan semakin rendahnya laju reaksi reduksi senyawa 2,6-dichloropenolindophenol. Penurunan aktivitas antioksidan pada daging akibat dari penambahan konsentrasi NaCl terjadi secara tidak signifikan. Namun semakin meningkatnya konsentrasi NaCl akan menurunkan aktivitas enzim katalase, superoksida dismutase, dan glutathion peroksidase pada daging (Tunieva & Kotenkova, 2017).

Senyawa antioksidan yang terkandung dalam tulang salmon adalah protein dan peptida. Sebanyak 16,65% protein terkandung dalam tulang salmon dan sebagian besar terdiri dari protein miofibrilar dan kolagen. Protein miofibrilar dapat diekstrak menggunakan larutan garam konsentrasi rendah (<2%) hingga tinggi (>2%). Penambahan garam pada ekstrak tulang salmon menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi garam yang digunakan akan menghasilkan penurunan aktivitas antioksidan yang semakin tinggi (Syahidawati & Limpisophon, 2019). Peningkatan garam dan suhu ekstraksi dapat menyebabkan oksidasi lemak sehingga meningkatkan jumlah radikal lipid peroksid (LOO•) (Kanner, 1994 dalam Syahidawati & Limpisophon, 2019). Kemudian radikal tersebut akan berinteraksi dengan peptida dan protein, maka aktivitas antioksidan berupa protein dan peptida akan menurun (Syahidawati & Limpisophon, 2019).

Dalam produk surimi, digunakan pati dalam proses pembuatan produk seafood berbasis surimi. Tepung ubi yang memiliki aktivitas antioksidan berpotensi dapat berperan sebagai pati dalam produk surimi. Selain itu, terdapat juga penambahan garam yang memiliki

fungsi untuk melarutkan protein dalam ikan sebelum dilakukannya proses denaturasi protein (pembentukan tekstur) (Matsumoto & Noguchi, 1992 dalam Chen et al., 2007). Namun proses pemberian garam dan pemanasan tersebut mempengaruhi aktivitas antioksidan pada ubi. Penambahan garam menimbulkan penurunan aktivitas antioksidan yang tidak signifikan (Chen et al., 2007).

Berbeda dengan bawang merah in brine, daging babi, ekstrak tulang salmon, dan surimi, penambahan garam pada produk pangan susu kedelai dengan penambahan polisakarida menghasilkan peningkatan aktivitas antioksidan. Susu kedelai merupakan salah satu produk pangan dengan komposisi yang tinggi dengan asam lemak tidak jenuh (PUFA). Penambahan polisakarida yang berasal spesies mikroalga merah air tawar (*Porphyridium aerugineum*) dilakukan pada susu kedelai dan disertai dengan penambahan garam (NaCl). Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur tingkat penurunan pembentukan produk oksidasi setelah ditambahkan senyawa KO<sub>2</sub> (reagen agen oksidasi) yaitu senyawa MDA (malonaldehid). Penambahan polisakarida menunjukkan adanya penurunan senyawa MDA. Pemberian garam berupa NaCl menyebabkan peningkatan penurunan pembentukan senyawa MDA. Dalam hal ini, keberadaan kation Na<sup>+</sup> mampu mengubah struktur tiga dimensi polisakarida diakibatkan oleh adanya ikatan nara kation pada garam dengan muatan negatif pada polisakarida. Perubahan struktur tersebut dapat meningkatkan kemampuan paparan antioksidan terhadap senyawa hasil oksidasi, maka peningkatan jumlah kation (konsentrasi garam



meningkat) dapat meningkatkan penurunan MDA (Burg & Oshrat, 2015).

## Referensi

Andriani, M., Amanto, B. S., & Gandes. (2012). Pengaruh Penambahan Gula dan Suhu Penyajian terhadap Nilai Gisi Minuman Teh Hijau (*Camellia sinensis* L.). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*, 5(2), 40–47. Retrieved from <https://jurnal.uns.ac.id/ilmupangan/article/view/13542>

Anggraeni, R., Lekahena, V. N. J., Kusumaningrum, I., & Supriyadi. (2017). Karakteristik Surimi Ikan Cucut (*Carcharhinus* sp). *Jurnal Ilmiah Agribisnis Dan Perikanan*, 10(2), 36–43. Retrieved from <https://ejournal.stipwunaraha.ac.id/index.php/AGRIKAN/article/download/203/208>

Anwar, H., Hussain, G., & Mustafa, I. (2018). Antioxidants from Natural Sources. *IntechOpen*, 1, 3–28. Retrieved from <https://www.intechopen.com/books/antioxidants-in-foods-and-its-applications/antioxidants-from-natural-sources>

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Bektas, B., & Bener, M. (2008). Chapter 14 Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Food Antioxidants : Vitamins , Polyphenolics , and Flavonoids (Vol. 477).

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of 'Antioxidant Power': The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 39(292), 70–76. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8660627>

Brewer, M. S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221–247. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>

Burg, A., & Oshrat, L. (2015). Salt Effect on the Antioxidant Activity of Red Microalgal Sulfated Polysaccharides in Soy-Bean Formula. *Mar. Drugs*, 13, 6425–6439. <https://doi.org/10.3390/md13106425>

Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2017). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>

Chen, J. C., Yeh, J. Y., CHen, P. C., & Hsu, C. K. (2007). Phenolic Content and DPPH Radical Scavenging Activity of Yam-containing Surimi Gels Influenced by Salt and Heating. *J. C. Chen et Al.*, 2(1--4), 1–11. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/228499429\\_Phenolic\\_content\\_and\\_DPPH\\_radical\\_scavenging\\_activity\\_of\\_yam-containing\\_surimi\\_gels\\_influenced\\_by\\_salt\\_and\\_heating](https://www.researchgate.net/publication/228499429_Phenolic_content_and_DPPH_radical_scavenging_activity_of_yam-containing_surimi_gels_influenced_by_salt_and_heating)

Cömert, E. D., & Gökmen, V. (2017). Evolution of food antioxidants as a core topic of food science for a century. *Food Research International*, 105, 2–87. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.056>

Mutiara, R., Priani, S. E., & Mulanti, D. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Kayu Manis (*Cinnamomum burmanni* Nees ex Bl.) dan Formulasinya dalam Bentuk Sediaan Masker Gel Peel Off. *Prosiding Penelitian SPeSIA Unisba 2015*, 602–606. Retrieved from

<http://karyailmiah.unisba.ac.id/index.php/farmasi/article/download/2132/pdf>

Octaviani, L. F., & Rahayuni, A. (2014). Pengaruh Berbagai Konsentrasi Gula terhadap Aktivitas Antioksidan dan Tingkat Penerimaan Sari Buah Buni (*Antidesma bunius*). *Journal of Nutrition College*, 3(4), 958–965. Retrieved from <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jnc/article/view/6916>

Proestos, C., & Komaitis, M. (2009). *Antioxidant Capacity of Hops. Beer in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00045-6>

Pujimulyani, D., Wazyka, A., Anggrahini, S., & Santoso, U. (2017). Pengaruh Penambahan Gula dan Asam Sitrat terhadap Aktivitas Antioksidan dan Waktu Rehidrasi Bubuk Instan Kunir Putih (*Curcuma mangga* Val.) hasil dum Drier. *Jurnal AgriSains* 28, 28–37. Retrieved from <http://lppm.mercubuana-yogya.ac.id/wp-content/uploads/2014/12/PENGARUH-PENAMBAHAN-GULA-DAN-ASAM-SITRAT-TERHADAP-AKTIVITAS-ANTIOKSIDAN-DAN-WAKTU-REHIDRASI-BUBUK-INSTAN-KUNIR-PUTIH-Curcuma-mangga-Val.-HASIL-DRUM-DRIER.pdf>

Puspitasari, E., & Ningsih, I. Y. (2016). Kapasitas Antioksidan Ekstrak Buah Salak (*Salacca zalacca* (Gaertn.) Voss) Varian Gula Pasir Menggunakan Metode Penangkal Radikal DPPH. *Pharmacy*, 13(1), 116–126. Retrieved from <http://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/PHARMACY/article/view/893>

Rais, I. R. (2016). Aktivitas Antioksidan Ekstrak *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Ness dengan Dua Perbedaan Penguapan. *Pharmaciana*, 6(1), 95–100. Retrieved from <http://journal.uad.ac.id/index.php/PHARMACIANA/article/view/3226>

Risfaheri, Handayani, A. A., & Seyadjit. (2018). Optimasi Produksi Bawang Merah Utuh (*Allium ascalonicum* L) in Brine. *Jurnal Penelitian Pascapanen Pertanian*, 15(1), 25–35. Retrieved from <http://ejurnal.litbang.pertanian.go.id/index.php/jpasca/article/download/8923/7956>

Sen, S., & Chakraborty, R. (2011). The Role of Antioxidants in Human Health. *ACS Symposium Series*, 1083, 1–37.

Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. (2018). Uji Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, 2(2), 82–89. Retrieved from <http://journal.ubaya.ac.id/index.php/MPI/article/download/1662/1360/>

Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 42(5), 556–564. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/2efc/0af6d122d6ddcc41b028a235c094cf9a0512.pdf>

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-tahan, Y., Dubinsky, Z., & Yehoshua, Y. (2013). Natural Antioxidants : Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4(6), 643–649. Retrieved from <https://www.scirp.org/Journal/PaperInformation.aspx?PaperID=32918>

Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., & Bhatnagar, S. (2013). Potential applications of antioxidants - A review. *JOPR: Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 828–835. <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>

Syahidawati, A., & Limpisophon, K. (2019). Effects of salt extraction and heating conditions on protein characteristics and antioxidant activity of salmon (*Salmo salar*) bone extract. *Agr. Nat. Resour*, 53, 1–8. Retrieved from [http://anres.kasetsart.org/inPress/PDF/ANRES2018\\_207\\_53-1\\_inpress\\_Kanokra@5-4Jan2019.pdf](http://anres.kasetsart.org/inPress/PDF/ANRES2018_207_53-1_inpress_Kanokra@5-4Jan2019.pdf)

Thorat, I. D., Jagtap, D. D., Mohapatra, D., Joshi, D. C., Sutar, R. F., & Kapdi, S. S. (2013). Antioxidants, their properties, uses in food products and their legal implications. *International Journal of Food Studies*, 2, 81–104. Retrieved from <https://www.iseki-food-ejournal.com/ojs/index.php/e-journal/article/view/134>

Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., & Gabriel, J. (2016). Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada

Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L). *Pengembangan Teknologi Kimia Untuk Pengolahan Sumber Daya Alam Indonesia*, 1–7. Retrieved from <http://jurnal.upnyk.ac.id/index.php/kejuangan/article/viewFile/1547/1420>

Tunieva, E. K., & Kotenkova, E. A. (2017). The Study on Effect of Sodium Chloride on The Antioxidant Activity of Meet. *Foods and Raw Materials*, 5(2), 4–10. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2017-2-105-111>

Wijayanti, N. P. A. D., Dewi, L. P. M. K., Astuti, K. W., & Fitri, N. P. E. (2016). Optimasi Waktu Maserasi untuk Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Rind Menggunakan Pelarut Etil Asetat. *Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 3(1), 12–16. Retrieved from <https://e-journal.unair.ac.id/JFIKI/article/download/4087/2761>

Wulansari, A. N. (2018). Alternatif Cantigi Ungu (*Vaccinium varingiaefolium*) sebagai Antioksidan Alami : Review. *Farmaka*, 16(2), 419–429.





REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

# SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00201988001, 10 Desember 2019

## Pencipta

Nama : **Soedarini, R. Probo Yulianto Nugrahedhi,**  
Alamat : Ngadinegaran MJ 3 No. 154 , Yogyakarta, Di Yogyakarta, 55143  
Kewarganegaraan : Indonesia

## Pemegang Hak Cipta

Nama : **LPPM Universitas Katolik Soegijapranata**  
Alamat : Jl. Pawiyatan Luhur IV/1, Bendan Dhuwur, Semarang, Jawa Tengah, 50234  
Kewarganegaraan : Indonesia  
Jenis Ciptaan : **Buku**  
Judul Ciptaan : **ANTIOKSIDAN BAHAN PANGAN DAN PENGUKURAN AKTIVITASNYA**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 10 Desember 2019, di Semarang

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama 50 (lima puluh) tahun sejak Ciptaan tersebut pertama kali dilakukan Pengumuman.

Nomor pencatatan : 000169547

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.

Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n. MENTERI HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA  
DIREKTUR JENDERAL KEKAYAAN INTELEKTUAL

Dr. Freddy Harris, S.H., LL.M., ACCS.  
NIP. 196611181994031001

## LAMPIRAN PENCIPTA

| No | Nama                        | Alamat                                       |
|----|-----------------------------|--|
| 1  | Soedarini                   | Ngadinegaran MJ 3 No. 154                    |
| 2  | R. Probo Yulianto Nugrahedi | Perum P 4 A Blok C1/2 Pudukpayung Banyumanik |

