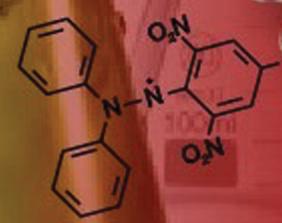
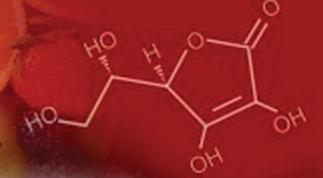
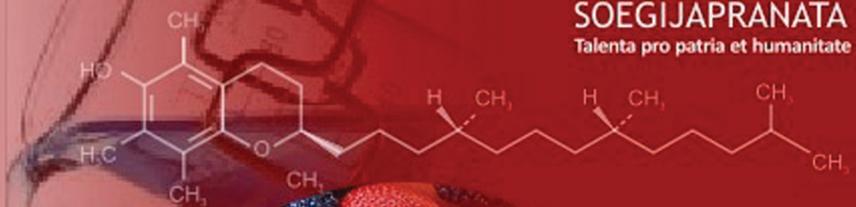
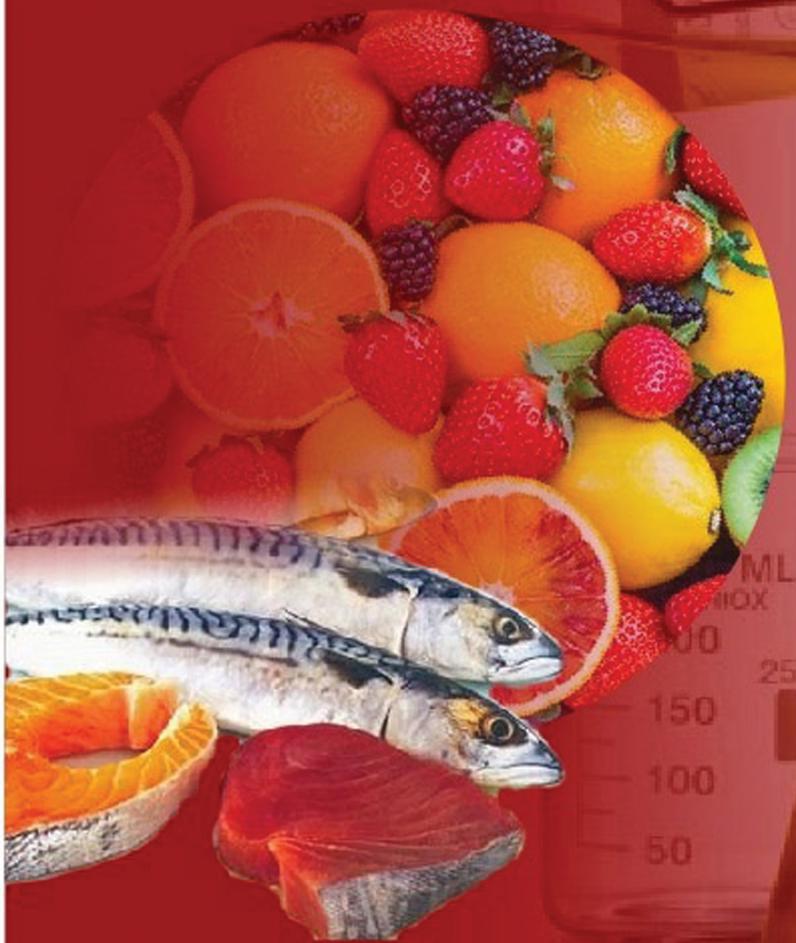


Antioksidan Bahan Pangan & Pengukuran Aktifitasnya



SOEDARINI
R. PROBO Y. NUGRAHEDI

UNIVERSITAS KATOLIK SOEGIJAPRANATA



ANTIOKSIDAN BAHAN PANGAN

Dan Pengukuran Aktivasnya

Oleh:

Soedarini

R. Probo Yulianto Nugrahedhi

ANTIOKSIDAN BAHAN PANGAN Dan Pengukuran Aktivasnya

Oleh:

Soedarini

R. Probo Yulianto Nugraedi

Hak Cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotocopy, merekam atau dengan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari Penulis dan Penerbit.

©Universitas Katolik Soegijapranata 2019

ISBN : 978-623-7635-07-9

Desain Sampul : Andreas Dian Prasetyo

Perwajahan Isi : Soedarini

Penerbit :

Universitas Katolik Soegijapranata

Anggota APPTI No. 003.072.1.1.2019

Jl. Pawiyatan Luhur IV/1 Bendan Duwur Semarang 50234

Telpon (024)8441555 ext. 1409

Website : www.unika.ac.id

Email Penerbit : ebook@unika.ac.id

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) tahaun anggaran 2019.

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

Semarang, Desember 2019

Soedarini



DAFTAR ISI

| | |
|---|-----|
| Kata Pengantar | iii |
| Daftar Isi | iv |
| Bab 1 Pendahuluan | 1 |
| 1.1. Antioksidan sebagai komponen fungsional untuk kesehatan | 1 |
| 1.2. Peran antioksidan dalam pengembangan produk pangan olahan | 4 |
| Bab 2 Antioksidan Ditinjau dari Aspek Kimia | 7 |
| 2.1. Antioksidan dan radikal bebas | 7 |
| 2.2. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan | 14 |
| Bab 3 Sumber Antioksidan Alami: Nabati | 17 |
| 3.1. Antioksidan dalam buah-buahan | 17 |
| 3.2. Antioksidan dalam sayur-sayuran | 20 |
| Bab 4 Sumber Antioksidan Alami: Hewani | 25 |
| Bab 5 Antioksidan Non Alami (Sintetis) | 37 |
| 5.1. Antioksidan untuk lemak dan minyak | 37 |
| 5.2. Tinjauan keamanan pangan antioksidan sintetis | 39 |
| Bab 6 Analisis Antioksidan | 41 |
| 6.1. Metode-Metode Analisis Antioksidan | 41 |
| 6.2. Tinjauan Khusus: Pengaruh Ion Na ⁺ dalam Uji DPPH | 46 |
| Daftar Referensi | 55 |

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 diabetis mellitus dan penyakit jantung. Penelitian terkini menunjukkan penderita diabetes mengalami kekurangan antioksidan seperti kekurangan askorbat, glutation, dan atau enzim superoksida dismutrase. Lebih lanjut, beberapa studi menunjukkan

bahwa kandungan serum dengan antioksidan tinggi (tokoferol) dapat menurunkan risiko terkena diabetes melitus tipe 2 (Sindhi et al., 2013).

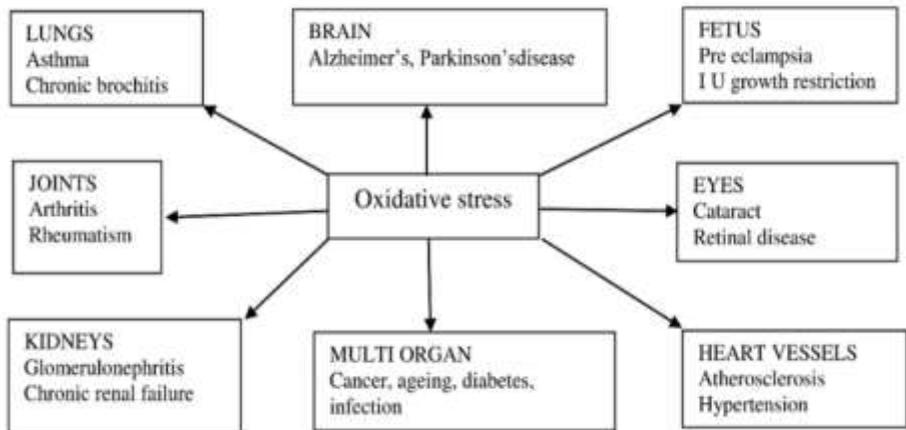
Dalam kehidupan manusia, oksigen merupakan bagian yang sangat dibutuhkan oleh tubuh manusia, khususnya untuk meregenerasi energi tubuh. Ditinjau dari ilmu biokimiawi, regenerasi energi di dalam tubuh manusia tersebut terjadi melalui pembentukan ATP (Adenosin Tri Phospat) di mitokondria sel. Namun dalam 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, truck, 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 ($\text{O}_2^{\bullet -}$), hidroksil ($\bullet\text{OH}$) 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, industri 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).

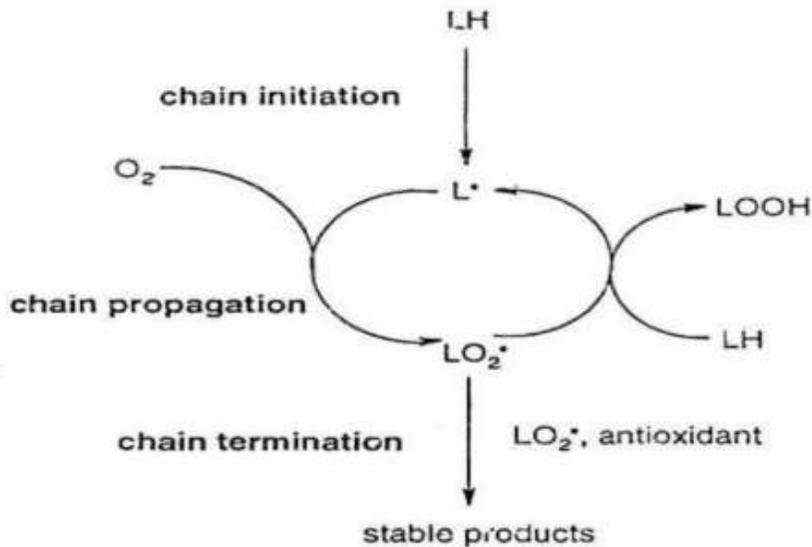
Radikal bebas sendiri dapat berasal baik dalam tubuh ataupun luar tubuh. Macam-macam atom dapat menjadi radikal bebas. Salah satunya adalah radikal hidrosil yang dianggap sebagai salah satu radikal bebas paling reaktif yang menyerang hampir setiap molekul dan inisiator reaksi berantai membentuk peroksidan 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 glutation (GSH) dan glutation 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, glutation, 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).



Gambar 1. Reaksi oksidasi berantai

Reaksi yang disebabkan dari radikal bebas akan menyebabkan reaksi 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) |
| Non-Enzimatik | Metabolik | <i>Reduces glutathion</i> (GSH), asam lipoid, L-arginin, koenzim Q ₁₀ , melatonin, asam urat, bilirubin, <i>metal-chelating protein</i> , transferin, dan lain-lain. |
| | Nutrien | Vitamin E, Vitamin C, karotenoid, <i>trace metal</i> (Se, Mn, Zn), flavonoid, omega-3, omega-6, dan lain-lain. |

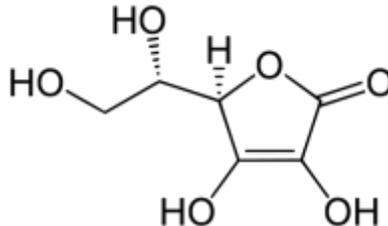
Lanjutan Tabel 1. Jenis Antioksidan Berdasarkan Sifat dan Mekanismenya

| Kelas antioksidan | Sub-kelas antioksidan | Jenis antioksidan |
|---|------------------------------|--|
| Antioksidan Berdasarkan Sumber | | |
| <i>Endogenous</i> | - | Bilirubin, glutation, asam lemak, N-asetil sistein, NADPH dan NADH, ubiquinone (koenzim Q ₁₀), 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) |
| Antioksidan Berdasarkan Mekanisme | | |
| Sistem Katalitik (untuk menetralkan atau mengubah ROS) | - | SOD, CAT, GPx |
| Mengikat/inaktivasi ion logam (mencegah produksi ROS) | - | Ferritin, caculoplasin, 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), glutathion 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 : Glutathion (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).

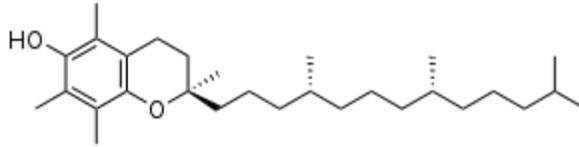


Gambar 2. Struktur Asam Askorbat

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 α , 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.

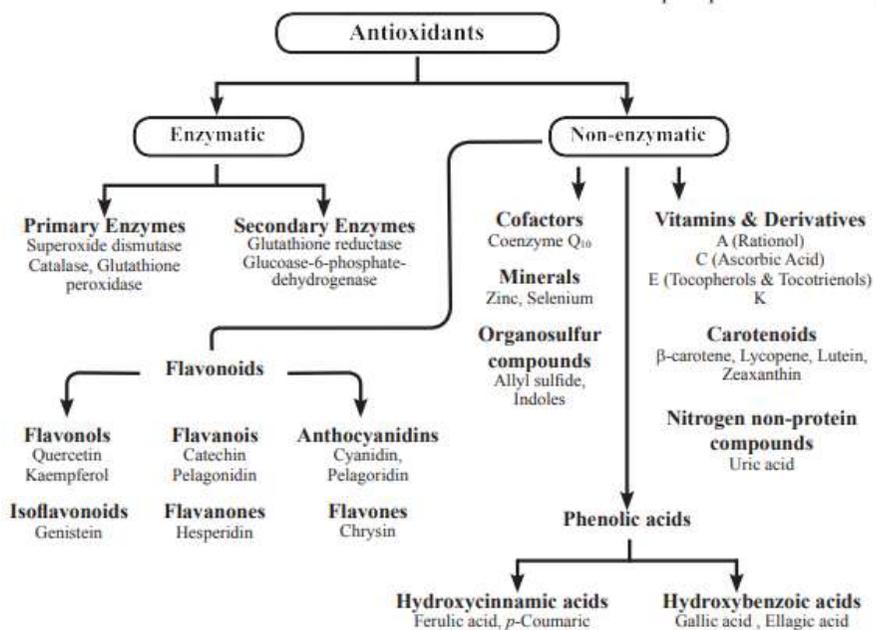


Gambar 3. Struktur α -tokoferol

2.2.Mekanisme reaksi senyawa antioksidan

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 selular dan sub selular 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 (α , β , γ , δ tokoferol dan α , β , γ , δ tokotrienol), namun hanya bentuk α -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 α -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 α -tokoferol dipengaruhi oleh suhu. Pada suhu 110⁰C aktivitas antioksidan α -tokoferol menurun, dan pada suhu 150⁰C α -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, β -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 beberapasifat 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.

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

Pada masing-masing sampel, *Lobiger serradifalci*; *Oxynae olivacea*; dan *Ruditapes decussatus*, pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada enzim katalase (CAT), *Superoxide dismutase* (SOD), 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_2O_2 menjadi air. Selanjutnya enzim GSH memiliki fungsi detoksifikasi peroksida dalam sel. Terakhir, mekanisme pengujian menggunakan LPO berfungsi untuk mengetahui aktivitas antioksidan enzimatik dalam mencegah proses peroksidase 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 ikatan peptide hasil ekstraksi jaringan dari Moluska, baik Moluska air laut ataupun Moluska air tawar dan darat.

| Jenis Antioksidan | Moluska | Asal Moluska | Aktivitas Tertinggi (IC50) | Referensi |
|---|--|-------------------|--|-----------------------------------|
| Flavonoid dan Alkaloid | Ketang 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 HO: 0,406 mg/ml O ₂ : 0,536 mg/ml ABTS: 2,75 mg/ml | (Chi, Hu, Wang, Li, & Ding, 2015) |
| Biopeptida (Leu-Ala-Asn-Ala-Lys) | <i>Saccostrea cucullata</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% TBAR: 176,77 | (Fahmy, 2014) |
| Taurine, GSH (glycine, glutamino, cysteine) | <i>Coelastrea aegyptiaca</i> (freshwater mussel) | Moluska Air Tawar | DPPH: 73,14% TBAR: 177,23 | (Fahmy, 2014) |

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 IC₅₀ 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 IC₅₀ 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 culculata*, 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 α -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 ebagai 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, Predecki, 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 enzimatis 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 pada β (1,4) dan β (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 ($\bullet\text{OH}$). (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 $\mu\text{g/ml}$ (75% at 1000 $\mu\text{g/ml}$) dan 250 $\mu\text{g/ml}$ (73% at 1000 $\mu\text{g/ml}$). Chitosan merupakan rantai linier polisakarida terdiri atas ikatan (1-4) pada monomer 2-amino-2-deoxy-b-D-glucofuranose. 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 pleuronectes*, 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 O₂, 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 O₂ 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.

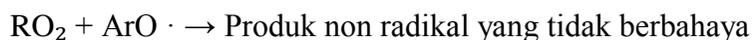
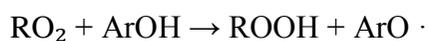
TBHQ Tert-butylhydroquinone (E-319) adalah antioksidan untuk keperluan umum yang banyak digunakan aplikasi. Kekuatannya

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.

BAB – 6

ANALISIS AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

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

6.2. Tinjauan Khusus: Pengaruh Ion Na⁺ 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

kontrol berupa larutan DPPH tanpa sampel (Puspitasari & Ningsih, 2016).

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

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 (± 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 oC. 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 KO₂ (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⁺ 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

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

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-journal.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.

