

Tanti Tatang Irianti  
Kuswandi  
Sindu Nuranto  
Purwanto

# Antioksidan dan Kesehatan



GADJAH MADA UNIVERSITY PRESS

## **ANTIOKSIDAN DAN KESEHATAN**

**Penulis:**

Tanti Tatang Irianti  
Kuswandi  
Sindu Nuranto  
Purwanto

**Penyunting bahasa:**

Alfiansari Aisyah Putri

**Proofreader:**

Alfiansari Aisyah Putri

**Desain sampul:**

Pram's

**Tata letak isi:**

Epic Akbar Kingpin

**Penerbit:**

Gajah Mada University Press  
Anggota IKAPI dan APPTI

**Ukuran** : 15,5 x 23 cm; xxii + 192 hlm

**ISBN** : 978-602-386-928-2

**Redaksi:**

Jl. Sendok, Karanggayam CT VIII, Caturtunggal  
Depok, Sleman, D.I. Yogyakarta 55281  
Telp./Fax.: (0274) 561037  
ugmpress.ugm.ac.id | gmupress@ugm.ac.id

**Cetakan Pertama:** Januari 2021

**Hak penerbitan © 2020 Gajah Mada University Press**

*Dilarang mengutip dan memperbanyak tanpa izin tertulis dari penerbit, sebagian atau seluruhnya dalam bentuk apa pun, baik cetak, photoprint, microfilm, dan sebagainya.*

# KATA PENGANTAR

Kesehatan manusia dan lingkungan sekitarnya mempunyai hubungan yang erat secara kimiawi (biokimiawi tubuh: usia, hormonal, dan enzimatik). Tingkat kesehatan manusia dipengaruhi oleh banyak faktor, baik dari dalam tubuh sebagai turunan nenek moyang (termasuk *chromosome defect* seperti penyakit degenaratif) maupun efek *stressor* dari luar seperti mendapatkan masalah kehidupan secara psikis, sosial, atau ekonomi. Kondisi kesehatan ini akan lebih parah dengan adanya pandemik seperti saat ini apabila imunitas tubuh menurun. Oleh karena itu, faktor luar, terutama pola makan dan pola hidup harus dijaga dengan baik. Keseimbangan tubuh sangat dipengaruhi oleh asupan sehari-hari. Keberadaan kontaminan (residu logam berat atau bahan kimia lainnya dalam sayur, buah, daging, susu, dan kosmetika) akan menurunkan daya tahan tubuh dengan indikator kondisi kesehatan individu. *Stressor* tersebut akan memengaruhi produksi radikal bebas dalam tubuh manusia sehingga dapat mengganggu keseimbangan mekanisme imunitas tubuh. Hal tersebut berkontribusi ke berbagai penyakit kronis seperti serangan jantung, Alzheimer, stroke, dan kanker.

Ada dua sumber radikal bebas yakni endogen (dari dalam) dan eksogen (dari luar). Sumber eksogen misalnya polusi udara, radiasi UV, sinar-X, pestisida, cemaran logam berat pada sayur, buah, dan asap rokok. Adapun sumber endogen radikal bebas berasal dari dalam tubuh sendiri seperti autooksidasi, oksidasi enzimatik, dan *respiratory burst*. Radikal bebas merupakan suatu atom molekul atau senyawa dengan satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga sangat reaktif dan dapat terbentuk dalam tubuh saat bernapas sebagai hasil samping proses oksidasi atau pembakaran, olahraga berlebihan, ketika terjadi peradangan, terpapar polusi lingkungan seperti dari asap rokok, kendaraan bermotor, radiasi, dan sebagainya.

Saat terjadi infeksi, radikal bebas diperlukan untuk membunuh mikroorganisme penyebab infeksi. Namun, paparan radikal bebas (bersifat reaktif) berlebihan dan terus-menerus dapat menyebabkan kerusakan sel, mengurangi kemampuan sel untuk beradaptasi terhadap lingkungannya sehingga timbul gangguan kesehatan atau penyakit, dan pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel (meninggalnya seseorang). Ada 10 jenis radikal bebas yang cukup berbahaya, yaitu asap rokok, polusi udara (asap kendaraan bermotor, industri, dan lain-lain), radiasi UV, pestisida, obat-obatan, dampak olahraga berlebihan, radioterapi, autooksidasi, oksidasi enzimatik, dan *respiratory burst*.

Kita dapat melakukan pencegahan terhadap dampak negatif radikal bebas ini dengan beberapa hal yaitu pola hidup sehat dan cerdas, berolahraga dengan dosis tepat (frekuensi 3–5 kali dalam satu minggu dengan durasi 45–60 menit), serta mengonsumsi sayur dan buah. Antioksidan ditemukan cukup banyak pada bahan pangan, seperti vitamin E, vitamin C, flavonoid, dan karotenoid. Flavonoid yang berada di dalam tanaman masih belum berbentuk molekul bebas sehingga penelitian kami di Fakultas Farmasi, UGM, menghidrolisis, baik dengan asam maupun basa untuk membuat flavonoid bebas sehingga meningkatkan aktivitas antioksidannya ( $IC_{50}$  cukup rendah).

Kekayaan hayati negara kita belum bereksplorasi maksimal di bidang antioksidan alami sehingga dengan adanya buku ini semoga mampu menjadi inspirasi bagi semua ilmuwan untuk membuat lebih banyak lagi produk bagus berdasarkan penelitian di farmasi. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan metode analisisnya dengan *spectrophotometer visible*. Adapun visualisasi metode DPPH menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan *reagen* semprot DPPH. Metode hidrolisis fraksi dari ekstrak etanol tanaman pada penelitian ini sudah beberapa kali dioptimalkan berdasarkan masukan-masukan Prof. Dr. Suwijiyono Pramono. Tahap selanjutnya adalah mengisolasi senyawa aktif atau senyawa-senyawa flavonoid bebas setelah dihidrolisis dan dielusidasi strukturnya. Selanjutnya, senyawa-senyawa aktif tersebut diuji insiliko untuk mengetahui gugus yang paling tinggi potensi antioksidannya kemudian disintesis untuk memperoleh senyawa aktif dalam jumlah banyak dalam waktu singkat. Secara simultan diuji *in vivo* atau preklinisnya.

Buku ini terdiri dari lima bab dengan masing-masing topik pembahasan. Bab I sebagai pendahuluan memaparkan oksidan secara umum, baik dari dalam tubuh maupun pengaruh dari luar. Bab II menjelaskan antioksidan sintetik dan alami, sedangkan Bab III memaparkan analisis penentuan tingkat besarnya potensi aktivitas antioksidan. Pada Bab IV dipaparkan mengenai proses isolasi flavonoid sebagai antioksidan alami dan Bab V mengemukakan penelitian tim penulis dari beberapa ekstrak yang mempunyai potensi antioksidan.

Dengan selesainya penulisan buku ini, bukan berarti tidak ada proses lebih lanjut secara ilmiah dan teknologinya. Walaupun masih jauh dari sempurna, semoga informasi ilmiah dalam buku ini dapat bermanfaat bagi mahasiswa dan masyarakat pada umumnya. Akhir kata, kami bersyukur pada Allah Swt. yang telah melimpahkan karunia-Nya. Diucapkan banyak terima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi dalam penulisan buku ini terutama Bapak Drs. H. Djuwadi, B.A. (almarhum), Ibu Hj. Badriyatun, dr. Intan FY., M.Sc., dr. S.A. Hakam Perkasa, Yahya Sabri P, Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe di Universitas Wuerzburg, Frau Dr. Isolde Friederick di Loerrach, Bapak Prof. Dr. Achmad Mursyidi, Bapak Prof. Dr. Ibnu Gholib Ganjar, Bapak Prof. Dr. Subagus Wahyuono, Bapak Prof. Dr. Suwijiyo Pramono, Bapak Prof. Dr. Agung Endro Nugroho, Ibu Dr. Andayana Puspitasari, Ibu Dr. Ritmaleni, Ibu Dr. Rumiwati, dan *Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD)-Bonn-Jakarta*.

Yogyakarta, 7 Januari 2020

Tim Penulis



# DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR.....	v
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xxi
<b>BAB I</b> OKSIDAN.....	<b>1</b>
1.1 Pengertian Oksidan.....	1
1.2 Pengertian Radikal Bebas.....	3
1.3 Sumber Radikal Bebas.....	6
1.3.1 Anion Superoksida.....	9
1.3.2 Radikal Peroksil.....	9
1.3.3 Radikal Hidroksil.....	10
1.3.4 Hidrogen Peroksida.....	11
1.3.5 Oksigen Singlet.....	11
1.3.6 Radikal Endogen.....	12
1.3.7 Radikal Eksogen.....	13
1.4 Tahapan Reaksi Pembentukan Radikal Bebas.....	60
1.4.1 Tahap Inisiasi.....	60
1.4.2 Tahap Propagasi.....	60
1.4.3 Tahap Terminasi.....	61
1.5 Efek Radikal Bebas.....	61
1.5.1 Efek Negatif Radikal Bebas.....	61
1.5.2 Efek Positif Radikal Bebas.....	66
<b>BAB II</b> ANTIOKSIDAN DANJENISNYA.....	<b>69</b>
2.1 Pengertian Antioksidan.....	69
2.2 Jenis Antioksidan.....	71
2.2.1 Antioksidan Alami.....	71

	2.2.2	Antioksidan Sintetik .....	83
BAB III		UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN .....	89
	3.1	Uji Aktivitas Antioksidan Secara <i>In Vitro</i> .....	90
	3.1.1	Menggunakan Bahan Kimia .....	90
	3.1.2	Materi Biologis .....	104
	3.1.3	Xantin Oksidase.....	104
	3.2	Uji Aktivitas Antioksidan Secara <i>In Vivo</i> .....	106
	3.2.1	Glutation Peroksidase (Gpx).....	106
	3.2.2	Uji Enzim Katalase .....	107
	3.2.3	Uji Superoksida Dismutase.....	110
	3.2.4	Penentuan Kadar Malonaldehid (MDA) Plasma Darah .....	116
BAB IV		ISOLASI FLAVONOID .....	119
	4.1	Ekstraksi.....	120
	4.1.1	Ekstraksi Dingin .....	120
	4.1.2	Ekstraksi Panas .....	122
	4.2	Proses Pemisahan Senyawa.....	123
	4.2.1	Kromatografi Lapis Tipis Preparatif .....	125
	4.2.2	Kromatografi Kolom.....	126
	4.2.3	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> (HPLC) .....	128
	4.2.4	Kromatografi Cair Vakum.....	129
	4.2.5	Kromatografi Lapis Tipis Sentrifugal .....	130
	4.2.6	Kromatografi <i>Flash</i> .....	131
BAB V		PENELITIAN MENGENAI ANTIOKSIDAN .....	133
	5.1	Uji Aktivitas Antioksidan dan Deteksi Senyawa Buah Talok ( <i>Muntingia calabura</i> L.) .....	133
	5.2	Uji Aktivitas Penangkapan Radikal dan Deteksi Golongan Senyawa Ekstrak Etanolik Terpurifikasi Batang Brotowali ( <i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers) .....	144
	5.3	Perbandinagan Inhibisi Ekstrak Air Buah Mahkota Dewa ( <i>Tinospora crispa</i> (L.) Miers) dan Vitamin C Terhadap Fotodegradasi Tirosin.....	153
	5.4	Uji Penangkapan Radikal Oleh Fraksi-Fraksi	



Ekstrak Bunga Kecombrang ( <i>Nicola speciosa</i> (Bl.) <i>Horan</i> ) dan Buah Talok ( <i>Muntingia calabura</i> L.) Menggunakan DPPH.....	155
DAFTAR PUSTAKA.....	159
INDEKS.....	185
TENTANG PENULIS.....	189



# DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Radikal bebas biologis (endogen) .....	7
Tabel 1.2	Spesies oksigen reaktif .....	12
Tabel 1.3	Tipe-tipe merkuri berdasarkan sumber, absorpsi, distribusi, ekskresi, dan alasan ketoksikannya .....	30
Tabel 2.1	Beberapa substitusi flavonoid dengan aktivitas antioksidan .....	76
Tabel 2.2	Kadar Antosianin dalam beberapa bahan pangan.....	82
Tabel 2.3	Antioksidan yang diizinkan digunakan dalam makanan	83
Tabel 2.4	Aturan penggunaan BHA dalam sediaan farmasi dan makanan .....	85
Tabel 2.5	Penggunaan BHT sebagai antioksidan.....	86
Tabel 3.1	Penggolongan uji antioksidan .....	89
Tabel 3.2	Tingkat kerusakan antioksidan dengan metode DPPH ..	93
Tabel 5.1	Pengaruh ekstrak air buah mahkota dewa dibandingkan dengan vitamin C terhadap fotodegradasi tirosin.....	155



# DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.1	Pembentukan radikal bebas .....	4
Gambar 1.2	Pengaruh ROS terhadap tubuh .....	8
Gambar 1.3	Beberapa spesies ROS .....	8
Gambar 1.4	Sumber radikal eksogen .....	14
Gambar 1.5	Berbagai sumber pencemaran timbal di lingkungan	18
Gambar 1.6	Serangan logam berat pada suatu sel dan keseimbangan antara produksi ROS dan pertahanan oleh antioksidan .....	19
Gambar 1.7	Efek peningkatan kadar timbal di darah .....	22
Gambar 1.8	Penggunaan merkuri secara global untuk berbagai penggunaan .....	25
Gambar 1.9	Mekanisme toksisitas merkuri dalam tubuh manusia	28
Gambar 1.10	Nilai toksisitas kadmium.....	34
Gambar 1.11	Keratosis arsenik (kiri) dan lesi kulit karena arsenikosis (kanan).....	39
Gambar 1.12	Mata dengan kondisi <i>Kayser-Fleischer rings</i> .....	44
Gambar 1.13	Aterosklerosis .....	62
Gambar 1.14	Kerusakan DNA akibat radikal bebas .....	63
Gambar 1.15	Mekanisme kerusakan lipid peroksidasi .....	64
Gambar 1.16	Tahapan terjadinya kerusakan lipid peroksidasi .....	65
Gambar 1.17	Efek radikal nitrit oksida untuk tubuh .....	66
Gambar 1.18	Efek radikal bebas jenis ROS dalam menghambat bakteri.....	67
Gambar 2.1	Antioksidan melindungi tubuh dari radikal bebas ....	71

Gambar 2.2	Sumber antioksidan alami .....	72
Gambar 2.3	Struktur kimia $\alpha$ -Tokoferol .....	73
Gambar 2.4	Struktur kimia asam askorbat.....	74
Gambar 2.5	Struktur substitusi flavonoid dengan aktivitas antioksidan .....	77
Gambar 2.6	Struktur kimia beberapa jenis flavonoid .....	78
Gambar 2.7	Struktur flavonoid dengan aktivitas antioksi dan tinggi .....	79
Gambar 2.8	Struktur kimia Genistin, Glistin, dan Daidzin.....	80
Gambar 2.9	Struktur kimia vitamin A .....	81
Gambar 2.10	Antosianin dapat mencegah penuaan dini.....	82
Gambar 2.11	Struktur kimia BHA .....	84
Gambar 2.12	Struktur kimia BHT .....	86
Gambar 2.13	Struktur kimia TBHQ .....	87
Gambar 3.1	Rumus struktur DPPH .....	91
Gambar 3.2	Mekanisme reaksi DPPH dengan antioksidan .....	92
Gambar 3.3	Reaksi resonansi pada radikal DPPH.....	92
Gambar 3.4	Reaksi pengikatan aldehida oleh senyawa p-asinidin .....	94
Gambar 3.5	Jalur reduksi sebagian dari oksigen dan enzim-enzim antioksidan .....	97
Gambar 3.6	Reaksi antara radikal ABTS dan antioksidan.....	99
Gambar 3.7	Reaksi antara antioksidan dengan <i>reagen</i> FRAP .....	102
Gambar 3.8	Skema reaksi xantin oksidase yang mengatalis oksidasi hipoxantin menjadi asam urat .....	105
Gambar 3.9	Mekanisme penangkapan endogen peroksida seluler .....	109
Gambar 3.10	Kerja enzim dalam menghambat radikal bebas dalam tubuh.....	110
Gambar 3.11	Sisi aktif Cu-Zn-SOD.....	111
Gambar 3.12	Struktur kimia tipe Cu-Zn-SOD .....	111

Gambar 3.13	Struktur SOD berbentuk tetramer .....	112
Gambar 3.14	Struktur kimia tipe Fe SOD/Mn SOD domain <i>alpha-hairpin</i> .....	112
Gambar 3.15	Prinsip penentuan aktivitas SOD .....	115
Gambar 3.16	Reaksi perubahan TMP menjadi MDA .....	118
Gambar 4.1	Profil KLT Preparatif fraksi C dengan fase gerak n-butanol : asetat glasial : air (4 : 1 : 5) pada (A) UV254 nm (B) UV366 nm.....	126
Gambar 4.2	Diagram blok KCKT .....	129
Gambar 5.1	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air .....	135
Gambar 5.2	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air terhidrolisis 1 jam .....	136
Gambar 5.3	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air terhidrolisis 3 jam .....	136
Gambar 5.4	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air terhidrolisis basa 1 jam.....	136
Gambar 5.5	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air terhidrolisis basa 3 jam.....	137
Gambar 5.6	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH kuersetin.....	137
Gambar 5.7	Hubungan kadar senyawa uji dengan % penangkapan radikal DPPH fraksi air terhidrolisis 1 jam .....	138
Gambar 5.8	Kromatogram hasil KLT pemisahan senyawa ekstrak beserta fraksi buah talok dengan fase diam silika gel F <sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : metanol : asam formiat (44 : 3,5 : 2,5); kromatogram dilihat pada sinar tampak (8.1) di bawah sinar UV254 (8.2) dan di bawah sinar UV366 (8.3) .....	140
Gambar 5.9	Kromatogram hasil KLT fraksi air dan fraksi air terhidrolisis setelah disemprot DPPH dengan fase diam silika gel F <sub>254</sub> dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat dengan perbandingan 7 : 2 : 1 dilihat	

	pada sinar tampak.....	141
Gambar 5.10	Kromatogram fraksi air sebelum dan sesudah hidrolisis buah talok dengan fase diam silika gel $F_{254}$ dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (7 : 2 : 1) kromatogram dilihat pada sinar tampak (10.1) kromatogram dilihat pada sinar UV254 (10.2) .....	142
Gambar 5.11	Kromatogram hasil KLT fraksi air sebelum dan sesudah hidrolisis buah talok dengan fase diam silika gel $F_{254}$ dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat (7 : 2 : 1) kromatogram dilihat pada sinar UV366; sebelum diuapi amonia dan disemprot $AlCl_3$ (11.1) setelah diuapi ammonia (11.2), dan setelah disemprot $AlCl_3$ (11.3).....	143
Gambar 5.12	Kromatogram hasil KLT fraksi air terhidrolisis asam dengan fase diam silika gel $F_{254}$ dan fase gerak toluen : etil asetat : asam formiat dengan perbandingan 7 : 2 : 1.....	144
Gambar 5.13	Morfologi batang brotowali .....	145
Gambar 5.14	Kromatogram pemisahan senyawa (fase diam silika gel $F_{254}$ fase gerak toluene : etil asetat : asam format (4 : 6 : 1 v/v/v)) diamati di bawah sinar UV 254 nm (kiri) dan sinar UV 366 nm (kanan). (a) ekstrak etanolik, (b) fraksi heksan, dan (c) fraksi etil asetat .....	146
Gambar 5.15	Kromatogram hasil pemisahan senyawa (fase diam silika gel $F_{254}$ fase gerak toluene : etil asetat : asam format (4 : 6 : 1 v/v/v)) diamati di sinar tampak setelah disemprot DPPH 0,2%. (a) ekstrak etanolik, (b) fraksi heksan, (c) fraksi etil asetat, dan (d) fraksi air .....	147
Gambar 5.16	Kromatogram hasil pemisahan senyawa (fase diam silika gel $F_{254}$ fase gerak toluene : etil asetat : asam format (4 : 6 : 1 v/v/v) diamati di bawah sinar UV 254, sinar UV 366, dan sinar tampak setelah disemprot DPPH 0,2%. (a) fraksi heksan dan (b) fraksi etil asetat.....	148



Gambar 5.17	Kromatogram hasil pemisahan senyawa (fase diam silika gel F <sub>254</sub> fase gerak toluene : etil asetat : asam format (4 : 6 : 1 v/v/v) diamati di bawah sinar UV 254, sinar UV 366, dan sinar tampak setelah disemprot DPPH 0,2%. (a) fraksi etil asetat (b) fraksi etil asetat.....	149
Gambar 5.18	Morfologi daun mengkudu .....	150
Gambar 5.19	Profil kromatogram ekstrak etanolik dan fraksinya ..	150
Gambar 5.20	Profil kromatogram ekstrak etanolik dan fraksinya ..	151
Gambar 5.21	Profil kromatogram dengan penyemprotan DPPH....	152
Gambar 5.22	Perbandingan aktivitas penangkapan radikal oleh sampel .....	153
Gambar 5.23	Morfologi buah mahkota dewa .....	154
Gambar 5.24	Morfologi bunga kecombrang.....	156
Gambar 5.25	Morfologi buah talok.....	156
Gambar 5.26	Kromatogram fraksi etil asetat dari ekstrak etanolik bunga kecombrang (kloroform : etil asetat dengan perbandingan 2 : 3 v/v) .....	157
Gambar 5.27	Kromatogram fraksi etil asetat buah talok (toluene : etil asetat : asam formiat dengan perbandingan 6 : 4 : 1) .....	157