

Studi Literatur Penggunaan Metode Non Enzimatis Fotoreduksi Rb-Nbt dalam Mengukur Aktivitas Antioksidan Sediaan Farmasi yang Mengandung Flavonoid

Rani Rahmawati, Ratih Aryani, Siti Hazar

Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Bandung, Indonesia

email: ranirahmarani@gmail.com, ratih_aryani@ymail.com, sitihazar1009@gmail.com

ABSTRACT: Flavonoids are widely utilized in pharmaceutical preparations an antioxidant that can affect the activity of the SOD enzymes in the body. To ensure the ability of an active compound as an antioxidant in the preparation of the pharmacy can used method non-enzymatic antioxidant activity of Rb-NBT. The purpose of this literature study is to determine the utilization of flavonoids as antioxidants in pharmaceutical preparations to increase the acvity of SOD and can find out the mechanism of the antioxidant testing method in measuring the activity of SOD. In this study used methods systematic literature review. The results of this study came to, flavonoids as antioxidants work inanely by increasing NrF2 activity and directly by donating one electron, to radical compounds and widely utilized in pharmaceutical preparations. The working principle of the Rb-NBT photoreduced method occurred in the competition for the capture of one electron[•] superoxide between NBT and the SOD in the sample. The result of the value % inhibition indicates the activity of the SOD in capturing radical superoxide.

Keyword : flavonoids, superoxide dismutase enzyme (SOD), Rb-NBT

ABSTRAK: Flavonoid banyak dimanfaatkan dalam sediaan farmasi sebagai antioksidan yang dapat mempengaruhi aktivitas enzim SOD dalam tubuh. Untuk memastikan kemampuan senyawa aktif sebagai antioksidan dalam sediaan farmasi tersebut dapat menggunakan metode pengujian aktivitas antioksidan non-enzimatis fotoreduksi Rb-NBT. Tujuan dari studi literatur ini untuk mengetahui pemanfaatan flavonoid sebagai antioksidan didalam sediaan farmasi untuk meningkatkan aktvitas enzim SOD dan dapat mengetahui mekanisme kerja dari metode pengujian antioksidan dalam mengukur aktivitas enzim SOD. Pada penelitian ini digunakan kajian pustaka dengan metode penelitian *systematic literature review*. Hasil dari penelitian ini didapatkan kesimpulan flavonoid sebagai antioksidan bekerja secara tidak langsung dengan meningkatkan aktivitas Nrf2 dan secara langsung dengan mendonorkan satu elektron yaitu atom H⁺ kepada senyawa radikal dan banyak dimanfaatkan dalam sediaan farmasi. Prinsip kerja dari metode fotoreduksi Rb-NBT terjadi kompetisi penangkapan satu elektron O₂^{•-} hasil fotoreduksi riboflavin antara NBT dan enzim SOD dalam sampel. Hasil dari nilai % inhibisi menunjukkan adanya aktivitas dari enzim SOD dalam menangkap radikal superoksida.

Kata kunci : flavonoid, enzim superoksida dimutase (SOD), riboflavin-NBT.

1 PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan senyawa terpenting dalam tumbuhan. Flavonoid termasuk kedalam kelas metabolit sekunder tanaman yang banyak ditemukan didalam buah-buahan dan sayuran (Herdiani, 2015). Flavonoid memiliki efek meningkatkan kesehatan yang luas. Flavonoid bayak digunakan dalam bidang farmasi karena

aktivitas flavonoid sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri dan lainnya. Flavonoid sebagai antioksidan ini telah banyak dipelajari dan dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan eksogen bagi tubuh manusia. Flavonoid sebagai antioksidan dapat menangkap langsung radikal superoksida dalam tubuh melalui sumbangan langsung atom hidrogen (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Keberadaan radikal bebas yang berlebihan didalam tubuh makhluk hidup dapat menyebabkan stress oksidatif yang bersifat berbahaya karena dapat merusak sel-sel yang akan menyebabkan timbulnya berbagai penyakit degeneratif seperti diabetes, ginjal, jantung, stroke, dan kanker (Ahmadinejad *et al.*, 2017). Didalam tubuh radikal bebas dalam bentuk spesi oksigen reaktif (ROS) yang merupakan hasil dari proses metabolisme dalam jumlah berlebih terbentuk karena olahraga atau aktivitas fisik yang terlalu berat ataupun dikarenakan radikal bebas dari luar tubuh seperti paparan sinar-X, polusi udara, paparan asap rokok, dan zat kimia (Neej *et al.*, 2013).

Tubuh manusia mempunyai kemampuan menangkal radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan, dengan mekanisme pertahanan antioksidan endogen berupa enzim antioksidan. Enzim-enzim yang bersifat antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), catalase (cat), dan glutathione peroksidase (Gpx) (Parwata, 2016). Enzim SOD merupakan suatu metaloenzim yang bekerja mengkatalis terjadinya dismutase anion superoksida yang bersifat reaktif menjadi oksigen dan senyawa yang tidak reaktif seperti hidrogen peroksida. SOD merupakan enzim yang stabil karena pada setiap subunitnya terdiri dari ikatan kovalen dan disusun oleh rantai disulfida. Enzim SOD merupakan pertahanan pertama sebagai antioksidan endogen (Mates *et al.*, 1999).

SOD memiliki peran dalam mencegah radikal bebas dan bersifat protektif. Kadar SOD menandakan status antioksidan yang digunakan sebagai bioindikator dalam tubuh pada kondisi stres oksidatif (Herdiani, 2015). Dalam penentuan potensi penangkal radikal superoksida dari suatu senyawa kompleks yang mempunyai potensi sebagai antioksidan pada umumnya digunakan uji *in vitro* secara tidak langsung yang disebut dengan uji superoksida dismutase (SOD) dengan menggunakan metode enzimatik dan non enzimatik (Deawati dkk, 2017). Pengujian aktivitas penangkal radikal bebas non enzimatik secara *in vitro* salah satunya dengan metode fotoreduksi riboflavin-nitroblueteazolium (Rb-NBT), metode ini digunakan untuk menentukan aktivitas penangkal radikal superoksida suatu senyawa yang merupakan teknik yang lebih mudah dan akurat dibandingkan metode enzimatik (Deawati dkk, 2018).

Berdasarkan uraian diatas, rumusan masalah

pada penelitian ini yaitu bagaimana pemanfaatan flavonoid sebagai antioksidan dalam sediaan farmasi terhadap aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD), serta bagaimana mekanisme kerja dari metode pengujian antioksidan fotoreduksi Rb-NBT dalam mengukur aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD).

Tujuan dari studi literatur ini adalah untuk mengetahui pemanfaatan flavonoid sebagai antioksidan didalam sediaan farmasi untuk meningkatkan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dan dapat mengetahui mekanisme kerja dari metode pengujian antioksidan dalam mengukur aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD).

Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai senyawa flavonoid yang dapat digunakan sebagai antioksidan alami dan metode pengujian aktivitas antioksidan secara *in vitro* dengan mengukur aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD).

2 LANDASAN TEORI

Radikal bebas dapat berupa suatu molekul, atom atau gugus yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga radikal bebas bersifat sangat reaktif, salah satu contoh radikal bebas adalah turunan oksigen reaktif (*Reactive Oxygen Specie*) (Parwata, 2016). Suatu molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan menjadi tidak stabil dan bersifat radikal, untuk dapat tetap stabil molekul ini akan mencari pasangan elektronnya dengan cara mengambil elektron dari molekul lain secara berlebihan (Khaira, 2010).

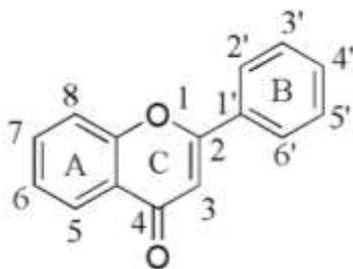
Senyawa radikal bebas dapat menyebabkan destruktif pada molekul sel yang elektronnya diambil oleh radika bebas. Pengambilan elektron ini akan menyebabkan reaksi berantai sehingga radikal bebas yang terbentuk akan semakin banyak. Senyawa radikal bebas akan merusak molekul pembentuk sel yaitu protein, karbohidrat, lemak dan DNA (Sadikin, 2002).

Banyaknya senyawa radikal bebas dan sedikitnya senyawa antioksidan endogen dalam tubuh akan menyebabkan terjadinya stress oksidatif, dimana pada keadaan ini akan menyebabkan terjadinya kerusakan mulai dari tingkatan sel samapi dengan kerusakan organ yang kemudian timbulnya penyakit degeneratif.

(Khaira,2010).

Senyawa antioksidan merupakan senyawa yang mampu menangkal dan meredam dampak negatif oksidan didalam tubuh. kerja dari antioksidan ini adalah mendonorkan satu elektron sehingga aktivitas senyawa oksidan menjadi terhambat. Pentingnya keseimbangan antara antioksidan dan oksidan sangat penting karena berkaitan dengan berfungsinya sistem imun tubuh. keseimbangan ini berfungsi untuk menjaga kerja dari membean lipid, protein sel, dan asam nukleat serta mengontrol transduksi signal dan ekspresi gen dalam sel imun. Komponen terbesar penyusun membran sel adalah senyawa asam lemak jenuh yang diketahui sangat sensitif terhadap perubahan keseimbangan oksidan-antioksidan, membran merupakan barrier penting demi berfungsinya sel, demikian juga membran sel imun terhadap serangan berbagai benda asing (antigen). Oleh sebab itu sel imun memerlukan antioksidan dalam kadar lebih tinggi dibandingkan dengan sel-sel lainnya (Hendriani, 2015).

Suatu senyawa antioksidan nonenzimatis banyak ditemukan dalam sayuran dan buah buahan dalam berbagai bentuk senyawa yang salah satunya adalah flavonoid. Flavonoid ini merupakan suatu bagian dari kelompok besar senyawa polifenol yang tersebar luas dalam berbagai bahan makanan. Flavonoid banyak terdapat didalam suatu tanaman dengan konsentrasi lebih tinggi berada pada daun dan kulit tanaman dibandingkan dengan jaringan yang lebih dalam (Winarsi, 2007). Flavonoid tersusun dari 15 atom karbon dengan dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga karbon (Parwata, 2016).



Gambar 1. Struktur dasar flavonoid (Panche, 2016)

Enzim superoksida dismutase adalah antioksidan endogen yang diproduksi oleh tubuh. Superoksida Dismutase (SOD) merupakan suatu metalloenzim yang mengandung atom tembaga, seng atau besi (Parwata, 2016). Superoksida

dismutase berfungsi dalam menangkal radikal bebas pada mitokondria, sitoplasma dan bakteri aerob dengan cara mengurangi bentuk radikal bebas superoksida (Khaira, 2010). SOD dapat ditemukan di otak, hati, sel darah merah, ginjal, tiroid, testis, otot jantung, mukosa lambung, kelenjar pituitari, pankreas dan paru-paru. SOD terdapat pada semua makhluk hidup yang mempunyai fungsi penting bagi perlindungan sistem aerobik untuk mencegah keracunan oksigen (Parwata, 2016).

Diantara enzim antioksidan, yang paling mampu memperbaiki efek stress oksidatif adalah enzim superoksida dismutase (SOD). Superoksida yang merupakan suatu radikal bebas yang bersifat sangat reaktif, enzim SOD bekerja mengkatalis perubahan superoksida menjadi hidrogen peroksida dan oksigen yang bersifat tidak reaktif.

Pemeriksaan aktivitas enzim SOD dilakukan untuk melihat kemampuan tubuh memproduksi antioksidan endogen dalam keadaan stress oksidatif. Salah satu metode dalam pengukuran aktivitas enzim SOD adalah dengan metode kolorimetri.

Sejumlah metode tersedia untuk penentuan aktivitas antioksidan dari ekstrak tumbuhan. Pengujian ini berbeda satu sama lain dalam hal reagen, substrat, kondisi eksperimental, media reaksi, dan metode evaluasi analitik standar. Evaluasi antioksidan alami dan sintetis memerlukan pengujian antioksidan (Panda, 2012). Untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan perlu dilakukan pengujian aktivitas. Analisis suatu senyawa antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* (di luar sel) dan *in vivo* (di dalam sel) (Parwata, 2016).

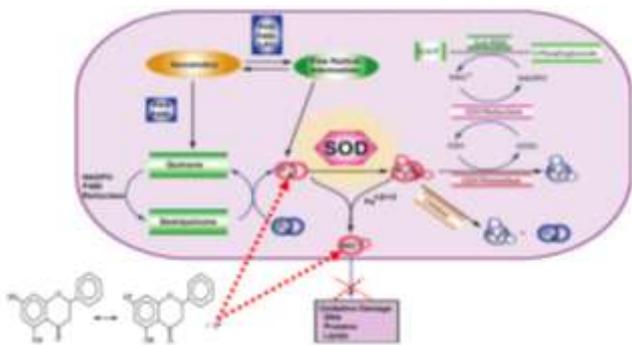
METODOLOGI PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan metode penelitian *systematic literature review*. Sumber penelitian yang digunakan berupa jurnal nasional yang terindeks sinta maupun internasional scopus, pubmed, google cendekia. Serta beberapa pustaka seperti buku dan *ebook*. Kata kunci yang digunakan adalah antioksidan, flavonoid, riboflavin, fotoreduksi, enzim superoksida dismutase, stress oksidatif dan *methods evaluation of antioxidant activity*. Semua kata kunci dicari secara individual dan dalam kombinasi.

3 PEMBAHASAN

Pengaruh Senyawa Flavonoid Sebagai Antioksidan Dalam Sediaan Farmasi Terhadap Aktivitas Enzim Superoksida Dismutase (Sod)

Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan dan mampu mencegah terjadinya kerusakan pada sel akibat adanya gangguan dari radikal bebas (Parwata, 2016). Flavonoid sebagai antioksidan bekerja secara langsung maupun tidak langsung. Secara umum kerja flavonoid sebagai antioksidan adalah memiliki kemampuan dalam menyumbangkan atom hidrogen dan flavonoid mempunyai kemampuan dalam mengkhelat ion logam transisi (Verma, 2012). Flavonoid secara langsung mampu mendonorkan satu atom hidrogen dari gugus hidroksil (OH) fenolik ketika bereaksi dengan radikal bebas. Kerja flavonoid secara tidak langsung adalah dengan meningkatkan aktivitas *nuclear factor-erythroid related factor-2* (Nrf2) yang berperan dalam produksi antioksidan endogen salah satunya adalah enzim superoksida dismutase (SOD) (Sumardika, 2012).



Gambar 2 Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya stres oksidatif (Parwata, 2016)

Pemanfaatan senyawa flavonoid sebagai senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang memiliki efek farmakologis banyak, salah satunya adalah aktivitas antioksidan. Berbagai studi telah banyak membahas flavonoid mempunyai efek farmakologis sebagai antibakteri, antiinflamasi, antioksidan, antidiabetes dll (Panche, 2016). Dengan banyaknya efek farmakologis dari flavonoid pemanfaatannya sebagai suplemen nutrisi di bidang farmasi telah banyak diteliti (Wang, 2017).

Pada sebuah penelitian yang dilakukan oleh Layal (2015) menunjukkan hasil dari pemberian kuersetin yang merupakan golongan dari flavonoid dengan pemberian dosis 100mg/kgBB

menunjukkan adanya peningkatan ekspresi protein Nrf2 pada nukleus jaringan ginjal hewan uji yang mengalami nefrektomi. Nrf2 mengontrol ekspresi gen yang berperan dalam detoksifikasi dan eliminasi oksidan reaktif dan dengan meningkatkan kapasitas antioksidan endogen seperti superoksida dismutase (SOD), catalase, dan glutathione (Nguyen, 2009). Flavon dapat menghambat stress oksidatif dengan mengatur transkrip gen heme oxygenase 1 (HO1) melalui jalur pensinyalan Nrf2 pada hepatosit primer tikus (Huang, 2012).

Dengan berkembangnya teknologi dalam bidang farmasi, pemanfaatan flavonoid sebagai antioksidan banyak digunakan terutama dalam bentuk sediaan oral. Sediaan antioksidan oral flavonoid bertujuan untuk menghambat terjadinya kerusakan sel karena adanya senyawa radikal bebas dalam tubuh. Tanaman pegagan (*Centella asiatica* (L) Urb) merupakan tanaman yang mengandung golongan senyawa antioksidan dengan mekanisme penangkapan radikal bebas. Dari hasil penelitian terhadap tanaman pegagan dapat mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba pegagan dengan mekanisme reaksi redoks (Salamah, 2014). Pada penelitian yang dilakukan oleh Diachayaty (2017) yang membuat sediaan tablet dari ekstrak alga coklat (*Padina minor*). Dari hasil penelitian tersebut sediaan tablet ekstrak alga coklat memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 9,6ppm. Aktivitas antioksidan ini diduga karena adanya kandungan senyawa flavonoid dalam tanaman alga coklat tersebut. penelitian lain yang dilakukan oleh Herdiana (2016) menunjukkan bahwa ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 3,757ppm dibuat dalam sediaan tablet. Aktivitas antioksidan ini karena adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak kayu secang yang dibuktikan melalui pengujian sediaan tablet menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

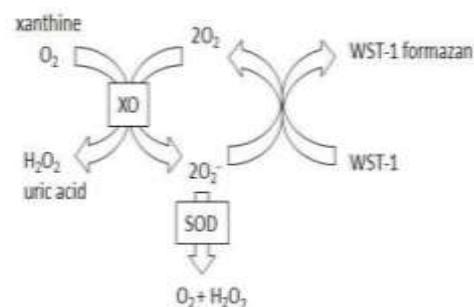
Karena flavonoid telah banyak dimanfaatkan dalam sediaan farmasi baik dalam bentuk kosmetik, suplemen maupun tambahan dalam bahan pangan, akan ada beberapa hal yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan dalam sediaan farmasi. Pada sediaan mikroemulsi ekstrak bawang hutan (*Eleutherine bulbosa*) yang dibuat oleh Sulastri (2015) sediaan mikroemulsi disimpan pada suhu 33°C dan 40°C pada hari pertama aktivitas antioksidan dalam mikroemulsi

IC₅₀ sebesar 101,167 ppm dan 89,956 ppm. Kemudian dilakukan kembali pengujian aktivitas antioksidan pada hari ke-35 dan hasil pengujian menunjukkan adanya penurunan aktivitas antioksidan IC₅₀ menjadi sebesar 127,254 ppm dan 101,996 ppm. Pada penelitian yang dilakukan oleh Firdiyani (2015) pada ekstrak *spirulina platensis* dengan pelarut aseton dan etil asetat secara berturut-turut mempunyai aktivitas antioksidan IC₅₀ 65,89ppm dan 76,36ppm, kemudian dibuat sediaan farmasi dalam bentuk tablet hisap dan dilakukan pengujian aktivitas antioksidan terhadap formula tablet hisap terpilih dan mempunyai aktivitas antioksidan IC₅₀ sebesar 288,68ppm. Kemudian penelitian yang dilakukan oleh (Adriana, 2014) memanfaatkan flavonoid sebagai antioksidan yang terkandung dalam ekstrak buah manggis, dibuat dalam sediaan tablet hisap yang dimana hasil penelitiannya aktivitas antioksidan mengalami penurunan sebesar 70,72% setelah digormulasi menjadi tablet hisap. Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya perlakuan terhadap ekstrak yang mempunyai aktivitas antioksidan dan adanya tahapan pada proses pembuatan sediaan farmasi seperti pelarutan, pemanasan, penyimpanan, perubahan suasana lingkungan karena adanya penambahan asam basa dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan, sehingga perlu adanya pengujian aktivitas antioksidan terhadap sediaan farmasi yang telah dibuat untuk memastikan kemampuan senyawa aktif sebagai antioksidan dalam sediaan farmasi tersebut.

Mekanisme Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Fotoreduksi Rb-NBT

Aktivitas antioksidan dari flavonoid erat kaitannya dalam meningkatkan aktivitas antioksidan endogen tubuh yaitu meningkatkan aktivitas enzim antioksidan seperti enzim superoksida dismutase (SOD). Pada umumnya pengukuran aktivitas enzim SOD dapat dilakukan dengan melakukan pemberian sampel antioksidan secara *in vivo* terlebih dahulu kepada hewan uji yang kemudian sampel biologis dapat berupa serum ataupun plasma darah dilakukan pengukuran aktivitas enzim SOD secara *in vivo* secara enzimatik. Seperti yang dilakukan oleh Butarbutar (2016) melakukan pengujian pengaruh dari ekstrak daun petai (*Parkia speciosa Hassk.*) yang diberikan kepada hewan percobaan dalam

waktu 14 hari kemudian plasma darah dari hewan percobaan digunakan untuk melihat pengaruh dari ekstrak daun petai terhadap kadar enzim SOD dalam plasma tikus dengan menggunakan metode pengujian kolorimetri. Dimana prinsip dari metode ini adalah pembentukan senyawa radikal superoksida oleh adanya enzim xantin oksidase, yang kemudian akan terjadi kompetisi penangkapan elektron oleh *water soluble tetrazolium salts* (WTS) yang akan membentuk warna biru dengan enzim SOD yang akan merubah radikal superoksida menjadi senyawa hidrogen peroksida (Abcam, 2019)



Gambar 3 Reaksi pengukuran aktivitas enzim SOD metode enzimatik (Abcam, 2019)

Banyaknya pengembangan metode pengujian aktivitas antioksidan bertujuan untuk mendapatkan hasil yang lebih akurat, metode pengujian yang lebih mudah, penggunaan bahan yang lebih sedikit dan lain-lain. Menurut Deawati (2018) pengujian aktivitas antioksidan dengan metode fotoreduksi non enzimatik lebih stabil dan mudah dikerjakan dari pada metode fotoreduksi enzimatik. Salah satu metode pengujian yang dapat digunakan adalah metode pengujian non enzimatik fotoreduksi riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT). Dengan melakukan metode yang sama seperti pada penelitian Buratbutar (2016) dimana dapat mengukur aktivitas antioksidan flavonoid dalam sediaan farmasi yang diinduksikan pada hewan uji yang kemudian pengukuran enzim SOD menggunakan metode non-enzimatik fotoreduksi Rb-NBT.

Metode pengujian aktivitas antioksidan fotoreduksi Rb-NBT ini dapat dilakukan pada berbagai macam sampel baik berupa sampel bahan alami maupun sintesis. Metode fotoreduksi Rb-NBT ini dapat mengukur aktivitas pada sampel hasil sintesis seperti pada sampel kompleks logam transisi flavonoid (Kostyuk *et al*, 2004) dan

senyawa kompleks Mn-salen (Deawati, 2018). Kemudian pada penelitian yang dilakukan oleh Retnoningrum (2016) metode fotoreduksi Rb-NBT ini digunakan untuk mengukur aktivitas enzim SOD hasil dari purifikasi dari bakteri *S. Equorum* dan *S. Saprophyticus*. Prinsip dari metode ini hampir sama dengan metode kolorimetri enzimatik. Prinsip metode fotoreduksi Rb-NBT ini adalah kemampuan senyawa kompleks dalam menghambat reduksi nitrobluetetrazolium (NBT) oleh spesi superoksida yang dihasilkan dari penyinaran terhadap riboflavin pada suhu 25°C (Deawati, 2018).

Sifat sensitif terhadap cahaya dari riboflavin dimanfaatkan dalam metode ini. Riboflavin akan terurai dengan cepat jika diradiasi dengan menggunakan sinar ultraviolet dalam waktu singkat (Juen, 2010). Efektivitas fotolisis pada riboflavin dikendalikan oleh panjang gelombang dari sumber cahaya. Kualitas cahaya biru dalam neon lampu sangat penting untuk fotodekomposisi riboflavin. Di dalam Studi, cahaya biru ditemukan menunjukkan reaksi fotokimia efisiensi tertinggi dari riboflavin. Disimpulkan bahwa LED cahaya biru lebih baik. Iradiasi oleh cahaya biru di 0,12 mW / cm² selama 30 menit ditentukan sebagai kondisi optimal untuk metode Rb-NBT (Cheng, 2015).

Dari hasil radiasi ini riboflavin akan menghasilkan radikal bebas berupa superoksida (Lin, 2008). Pada uji aktivitas penangkal radikal superoksida dengan metode fotoreduksi riboflavin-nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) terjadi dua tahapan reaksi. Yang pertama, terjadi reaksi fotokimia dengan adanya pencahayaan menyebabkan riboflavin tereksitasi dan kemudian tereduksi oleh tetrametiletlenadiamina (TEMED) menjadi semikuinon kemudian reaksi kedua, semikuinon yang terbentuk akan mendonorkan satu elektron pada oksigen di lingkungan, yang kemudian membentuk radikal superoksida. Selanjutnya terjadi reaksi kompetisi penangkapan satu elektron O₂^{•-} antara NBT dan sampel kompleks, yang teramati dengan terjadinya perubahan warna NBT dari kuning (sebelum tereduksi) menjadi ungu (setelah tereduksi oleh radikal superoksida membentuk NBT-diformazan) (Deawati dkk, 2018).

Tahapan dalam mengukur aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode non-enzimatis fotoreduksi Rb-NBT ini adalah sampel

uji yang akan diukur aktivitas antioksidan dicampur dengan larutan riboflavin, tetrametiltetramina (TEMED) dalam dapar fosfat pH 7,4-7,8 dan NBT. Campuran kemudian dikenakan paparan cahaya *fluorescent* selama 5 menit kemudian campuran larutan diukur nilai absorbansi dalam lempeng mikro pada panjang gelombang 550nm (Kostyuk, 2004; Retnoningrum, 2016; Deawati, 2018).

Untuk menghitung dan mengukur kemampuan sampel dalam menangkap superoksida pada pelaksanaannya dibuat larutan standar atau pembanding. Untuk mendapatkan nilai persen inhibisi reduksi perbedaan nilai absorbansi antara sampel kosong tanpa enzim dengan sampel mengandung enzim yang kemudian dikalikan 100% (Retnoningrum, 2016). Persen inhibisi ini dapat dihitung dengan selisih antara serapan larutan tak terinhibisi ($A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 2}}$) dan serapan larutan terinhibisi ($A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 3}}$) dibagi dengan serapan larutan tak terinhibisi dikali 100% (Deawati, 2018).

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 2}})}{(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}})} \times 100$$

Nilai peredaman radikal bebas dinyatakan dengan nilai IC₅₀ (*inhibitory concentration*), nilai IC₅₀ ini menjadi parameter dalam menginterpretasikan hasil pengujian dan didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji dapat meredam 50% senyawa radikal. Kecilnya nilai IC₅₀ maka menunjukkan bahwa senyawa kompleks yang diuji memiliki aktivitas antioksidan dalam meredam radikal yang tinggi. Secara tidak langsung aktivitas dari enzim SOD yang ada dalam sampel dapat terukur, dimana dengan tingginya nilai %inhibisi menunjukkan adanya aktivitas dari enzim SOD dalam menangkap radikal superoksida. Metode non enzimatis fotoreduksi Rb-NBT mempunyai kelebihan dibandingkan dengan metode enzimatis dalam mengukur aktivitas antioksidan dengan mengukur peningkatan aktivitas enzim SOD. Metode ini lebih mudah dilakukan dan lebih stabil dalam pelaksanaannya (Deawati, 2018).

4 KESIMPULAN

Dari studi literatur yang telah dilakukan didapatkan kesimpulan yaitu :

1. Banyak peran senyawa flavonoid dalam sediaan farmasi salah satunya adalah dimanfaatkan sebagai antioksidan. flavonoid sebagai antioksidan bekerja secara tidak langsung dengan meningkatkan aktivitas *nuclear factor-erythroid related factor-2* (Nrf2) dan secara langsung dengan mendonorkan satu elektron yaitu atom H⁺ kepada senyawa radikal.
2. Prinsip kerja dari metode fotoreduksi Rb-NBT terjadi kompetisi penangkapan satu elektron O₂^{-•} hasil fotoreduksi riboflavin antara NBT dan enzim SOD dalam sampel. Hasil dari nilai % inhibisi menunjukkan adanya aktivitas dari enzim SOD dalam menangkap radikal superoksida.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dalam mengukur aktivitas antioksidan sediaan farmasi yang mengandung flavonoid dalam meningkatkan aktivitas enzim superoksida dismutase (SOD) dengan menggunakan metode non-enzimatik fotoreduksi Rb-NBT.

DAFTAR PUSTAKA

- Abcam. (2019). Cellular Superoxide Detection Assay Kit (ab139477) datasheet.
- Adriana CR, Mufrof, dan Chabib L. (2014). Formulasi Tablet Hisap Kulit Buah Manggis (*Gracinia mangostana* L) sebagai Antioksidan dengan Variasi Konsentrasi Gelatin Sebagai Bahan Pengikat. *KJM*. Volume 4(2): 47-54.
- Ahmadinejad, F, *et al.* (2017). Molecular Mechanisms behind Free Radical Scavengers Function against Oxidative Stress. *Antioxidants*. Volume. 6(51).
- Butarbutar RH, Robiyanto, dan Untari EK. (2016). Potensi Ekstrak Etanol Daun Petai (*Parkia speciosa* Hassk.) Terhadap Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Pada Plasma Tikus yang Mengalami Stres Oksidatif. *Pharm Sci Res ISSN*. Volume 3(2): 97-106.
- Cheng C *et al.* (2015). Investigations of Riboflavin Photolysis Via Colored Light in the Niteobluetetrazolium Assay for Superoxide Dismutase Activity. *JPPB*. Volume 148: 262-267.
- Deawati, dkk. (2018). Metode Non-Enzimatik Riboflavin-Nitrobluetetrazolium (Rb-NBT)

Sebagai Teknik Penentuan Aktivitas Penangkal Radikal Bebas Anion Superoksida pada Kompleks Mangan(III)-Salen. *CNA. Volume. 6 (1) : 12-18.*

- Herdiani N., Wirjatmadi B., dan Adriani M. (2015). 'Pemberian Ekstrak Kelopak Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa*) Meningkatkan Kadar Superoksida Dismutase (Sod) Tikus Wistar Yang Diberi Minyak Jelantah'. *JIK*. Volume. 4 (2): 13-22.

- J.W. Juen, H.L. Jian, J.Y. Liang. (2010). The effect of illuminance on light induced reduction of nitro blue tetrazolium. *MCTB*.

- Khaira K. (2010). Menangkal radikal bebas dengan anti-oksidas. *JS*. Volume 2 (2):183-187

- Kostyuk VA, Potapovich AI, Strigunova EN, Kostyuk TV, Afanas'ev IB (2004) Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *ABB* 428:204–208

- Loyal K. (2015). Efek Proteksi Kuersetin Terhadap Ginjal Tikus Model Penyakit Ginjal Kronik Melalui Jalur *Nuclear Factor-Erhytroid-2 Related Factor* (Nrf2). Universitas Indonesia.

- Lin, R.R. Eitenmiller, W.O. (2008). Riboflavin, in: Vitamin Analysis for the Health and Food Sciences. *CRC Press*: 329–360

- Mates *et al.* (1999). 'Antioxidant enzymes and human disease'. *CB*. Volume. 32 (8) :595-603

- Nguyen T, *et al.* (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *TJBC*. Volume. 284 (20) : 13291–13295

- Panche A. N., Diwan A. D., dan Chandra. S. R. (2016). 'Flavonoid: On a Review'. *JNS*. Volume. 5(47) : 1-15.

- Parwata, I. (2016). Diktat Antioksidan. Universitas Udaya: Denpasar.

- Retnoningrum, D.S., Rahayu, A.P., Mulyanti, D., Dita, A., Valerius, O. & Ismaya, W.T. (2016). Unique characteristics of recombinant hybrid manganese superoxide dismutase from *Staphylococcus equorum* and *S. saprophyticus*. *PJ*. Volume. 35(2): 136–144

- Sumardika IW, dan Jawi IM. (2012). Ekstrak Air Daun Ubijalar Ungu Memperbaiki Profil Lipid dan Meningkatkan Kadar SOD Darah

- Tikus yang Diberi Makanan Tinggi Kolesterol. *JIK. Volume 42 (2): 67-70.*
- Sadikin, 2002. *Biokimia Enzim*. Cetakan I. Penerbit Widya Medika. Jakarta.
- Verma AK, et al. (2012). Flavone-based novel antidiabetic and antidyslipidemic agents. *JMC. Volume. 55 (10): 4551–4567.*
- Wang, T. yang, Li, Q., & Bi, K. shun. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *AJPS, Volume 13 (1): 12–23.*
- Winarsi H. (2007). *Antioksidan Alami & Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.