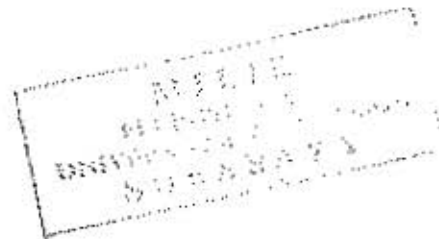


TESIS

UJI PERBANDINGAN AKTIVITAS  
SKUALENA DENGAN  $\alpha$ - TOKOFEROL  
SEBAGAI PENANGKAP RADIKAL DIFENIL PIKRIL HIDRAZIL  
DAN  
ANTIPEROKSIDA LEMAK DALAM HOMOGENAT HEPAR  
TIKUS DENGAN INDUKSI *ter*-BUTIL HIDROPEROKSIDA

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



ANIEK SETIYA BUDIATIN

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
1999

**UJI PERBANDINGAN AKTIVITAS  
SKUALENA DENGAN  $\alpha$ - TOKOFEROL  
SEBAGAI PENANGKAP RADIKAL DIFENIL PIKRIL HIDRAZIL  
DAN  
ANTIPEROKSIDA LEMAK DALAM HOMOGENAT HEPAR  
TIKUS DENGAN INDUKSI *fer*-BUTIL HIDROPEROKSIDA  
PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS**

**TESIS**

**Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Ilmu Farmasi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga**

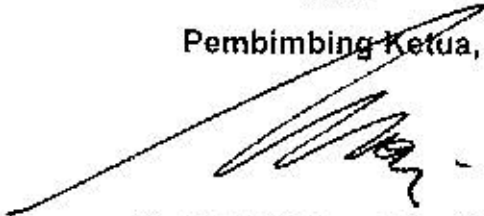
**Oleh :**

**ANIEK SETIYA BUDIATIN  
NIM : 099612294 M**

**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
Tanggal 31 Agustus 1999**

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 25 SEPTEMBER 1999**

Oleh  
Pembimbing Ketua,



**Dr. H.M. Zainuddin, Apt.**  
NIP : 130 517 154

Pembimbing



**Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt.**  
NIP : 130 809 084

Mengetahui  
Ketua Program Studi Ilmu Farmasi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga



**Dr. Widji Soeratri, DEA, Apt.**  
NIP : 130 611 501

Telah diuji pada

Tanggal 31 Agustus 1999

PANITIA PENILAI TESIS

Ketua : Prof. Drs. Soemadi, Apt.

Anggota : Dr.H.M. Zainuddin, Apt.  
Dr. Mulja Hadi Santosa, Apt.  
Dr. Gde Nyoman Astika , Apt.  
Dr. Wahjo Djatmiko, Apt.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama- tama saya panjatkan puji syukur kehadiran Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang atas segala Rahmat dan KaruniaNya sehingga tesis ini dapat diselesaikan .

Terima kasih tak terhingga dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr.H.M.Zainuddin,Apt., Pembimbing Ketua yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Terima kasih sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya ucapkan kepada Dr. Mulja Hadi Santosa, Pembimbing yang dengan penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan dan saran.

Saya ucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada Pemerintah Republik Indonesia c.q. Menteri Pendidikan dan Kebudayaan melalui Team Manajemen Program Doktor yang telah memberikan bantuan finansial sehingga meringankan beban saya dalam menyelesaikan tesis ini.

Dengan selesainya tesis ini perkenankan saya mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

Rektor Universitas Airlangga Prof H Soedarto, dr, DTMH, PhD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan program Magister.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr Soedijono, dr atas kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Uninersitas Airlangga.

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang hingga pertengahan pendidikan dijabat Dr Purwanto, Apt , yang kemudian dijabat Dr Fasich, Apt atas kesempatan yang diberikan pada saya untuk mengikuti pendidikan program Magister.

## RINGKASAN

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi dengan metoda AOAC ; identifikasi serta uji aktifitas antiradikal bebas DPPH dan uji antiperoksida lemak dalam homogenat hepar tikus Strain Wistar Jantan dengan induksi *tert*-butil hidrogenperoksida skualena dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol yang diperoleh dari nelayan pantai Sendang Biru Malang Selatan.

Isolasi skualena dilakukan berdasarkan reaksi penyabunan minyak hati ikan Hiu Cucut Botol dengan KOH dalam etanol dan direfluk selama 30 menit ; hangat- hangat ditambah heksana dan air-alkohol. Fase tak tersabunkan yaitu fase heksana yang mengandung skualena dipisahkan, fase ini dinamakan skualena kasar. Setelah itu dilakukan pemurnian skualena secara kromatografi kolom. Skualena murni dimasukkan kedalam botol coklat, dialiri gas nitrogen dan hasilnya ditimbang dan diperoleh hasil isolasi =  $75,830 \pm 1,140$  %.

Skualena hasil isolasi diidentifikasi dengan kromatografi lapisan tipis (KLT) dengan fase gerak heksana dan dilihat dibawah lampu UV terlihat satu noda dengan  $R_f = 0,457$  sedangkan skualena standard baku  $R_f = 0,457$ . Identifikasi dengan spektroskopi infra merah ( FTIR ) diperoleh pita serapan pada bilangan yang sama antara skualena standard baku dan skualena isolat yaitu :  $300-200 \text{ Cm}^{-1}$  dan  $1450 - 1350 \text{ Cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus metil dan metilena ; pita 1668,58 dan 1446,74 menunjukkan adanya

ikatan rangkap ; 1381 dan 1379,23 serta 833,2 menunjukkan adanya cabang . Identifikasi dengan kromatografi gas diperoleh satu puncak yang sama yaitu pada menit ke 9 dan hasil spektra - massa yang identik pula yaitu pada  $m/e = 41(C_3H_5)$ ;  $55(C_4H_7)$ ;  $69(C_5H_7)$ ;  $81(C_6H_7)$ ;  $95(C_7H_{11})$ ;  $109(C_8H_{13})$ ;  $123(C_9H_{11})$ ;  $137(C_{10}H_{16})$ ;  $149(C_{11}H_{17})$ ;  $161(C_{12}H_{17})$ ;  $177(C_{13}H_{21})$ ;  $191(C_{14}H_{25})$ ;  $231(C_{17}H_{29})$  dan  $410(C_{30}H_{50})$  . Identifikasi dengan resonansi magnetik inti (RMI ) menghasilkan geseran kimia 17,514 (C-1=cis) ; 25,289 (C-1c = trans) ; 130,601 (C-2); 124,168 dan 124,320 (C-3,C-7 & C-11 ) ; 26,661 ; 26,814; 28,277 ( C-4,C-8 & C-12 ) ; 39,741 ( C-5 & C-9 ) ; 134,412 ; 134,595 ( C-6 & C -10 ) jadi ada 15 atom karbon yang identik antara baku dan isolat.

Linieritas dari DPPH dalam etanol dilakukan dengan membuat larutan dengan kadar 0,04 % yang dianggap sebagai larutan induk 100 % dari induk tersebut dibuat berbagai kadar yaitu 90 % ; 80 % ; 70 % ; 60 %; 40 % ; 30 %; 20 % dan 10 % ; kemudian masing - masing diamati pada  $\lambda = 517,0$  nm. Dihasilkan kurva linier dengan  $r = 0,987$  dan persamaan garis linier :  $Y = 0,0256 + 0,00914 X$

Uji antiradikal bebas dari skualena dan pembanding  $\alpha$  - tokoferol dilakukan dengan melarutkan masing - masing bahan aktif dalam etanol dan dibuat 6 macam kadar; kemudian diamati absorpsinya dengan spektrofotometer pada  $\lambda_{maks}$  = 517,0 nm. Kemudian dihitung persentasi peredaman dari larutan DPPH oleh bahan aktif.



Hasil uji aktivitas antiradikal bebas DPPH ditunjukkan dengan % aktivitas rata-rata tiap ppm dari skualena isolat; skualena baku dan  $\alpha$  - tokoferol yang dihitung berdasarkan luas area dibawah kurva dari 0 jam sampai 5 jam secara berurutan sebagai berikut :  $0,00031 \pm 0,00014$  % ;  $0,00405 \pm 0,00006$  % / ppm dan  $13,14867 \pm 1,04648$  % / ppm.

Uji antiperoksida lemak dari skualena dan pembanding  $\alpha$  - tokoferol dilakukan dengan membuat masing - masing 5 macam kadar bahan aktif dalam media homogenat hepar tikus putih dengan cara sebagai berikut : blanko I berisi homogenat + bahan aktif + aquabides ; blanko II berisi homogenat + aquabides; kontrol berisi homogenat + aquades + t- BHP dan larutan uji berisi homogenat + aquades + bahan aktif + t-BHP kemudian dipanaskan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit. Setelah itu masing - masing diambil 1,3 ml larutan masuk ketabung lain yang berisi HCL 0,25 N ; larutan SDS 10 % dan larutan TBA 1 % kemudian dipanaskan  $95^{\circ}\text{C}$  selama 45 menit Setelah dingin ditambah 4,0 ml butanol dan divortek ; kemudian disentrifus untuk memisahkan fase butanol dan fase air. Fase butanol diamati dengan spektrofлуorometer pada  $\lambda$  Eks. = 539 nm dan  $\lambda$  Em. = 549 nm.

Linieritas larutan kontrol (TBARS = MDA -TBA ) dari homogenat dilakukan dengan mengencerkan larutan tersebut yang dianggap kadarnya 100 % menjadi beberapa macam kadar yaitu 90 % ; 80 % ; 70 %; 60 %; 50%; 40 %; 30 %; 20 % dan 10 % masing - masing diamati dengan spektrofлуorometer pada  $\lambda$  Eks. = 539 nm dan  $\lambda$  Em. = 549 nm.

Hasil uji aktivitas antiperoksida lemak diperoleh dari rata-rata % aktivitas tiap-tiap ppm bahan aktif dari skualena isolat ; skualen baku dan  $\alpha$  - tokoferol secara berurutan adalah sebagai berikut :  $0,2884 \pm 0,0233$  % ;  $0,5841 \pm 0,0994$  % / ppm dan  $1,0479 \pm 0,1652$  % / ppm.

## ABSTRACT

Squalene consist six 2-methyl-2-pentene units, that every unit as quaternary carbons can release electron easely ( electron donate ) suspiciused had activity to scavenge free radical and antilipidperoxide . The scavenger free radical activity of squalene was tested against a solution of diphenyl picryl hidrazyl radical and the decoloration determined with UV-Vis spectroscopic at  $\lambda = 517$  nm. The anti-lipoperoxidative activity was tested against a solution of *ter*- butyl hydroperoxide ( *ter*-BHP ) that induced lipid peroxidation in rat liver homogenate and the yield of TBARS = Thio Barbituric Acid Rreactive Substances ( Malondialdehyde-thiobarbituric acid = MDA ) determined with spectrofluorometric at  $\lambda_{Em} = 539$  nm;  $\lambda_{Ex} = 549$  nm.

The specific activity antiradical DPPH ( % antiradikal activity per ppm ) by isolated and standard squalene were lower than  $\alpha$ - tocopherol as nature antioxidant respectively  $0,00031 \pm 0,00014$  %/ppm ;  $0,00405 \pm 0,00006$  % and  $13,14867 \pm 1,04648$  % / ppm. The specific activity antilipoperoxidation by isolated and standard squalene were lower than  $\alpha$ - tocopherol respectively  $0,2884 \pm 0,0223$  % / ppm;  $0,5841 \pm 0,09945$  % / ppm and  $1,0479 \pm 0,1652$  % / ppm

The results suggest that isolated and standard squalene scavenged DPPH radical activity and anti-lipoperoxidation activity were lower than  $\alpha$ - tocopherol.

Keywords : squalene ;  $\alpha$ - tocopherol; antioxidant ; rat liver; lipid peroxidation ;  
DPPH ; *ter*-BHP

## SINGKATAN

AOAC	= Association of Official Analytical Chemists
DPPH	= Diphenyl Picryl Hydrazil
FTIR	= Fourier Transform Infra Red
GC-MS	= Gas Chromatography - Mass Spectra
HCl	= Hydro Chloric Acid
KOH	= Kalium Hidroksida
LSD	= Least Significant Different
MDA	= Malondialdehyde
NMR	= Nuclear Magnetic Resonance
RMI	= Resonansi Magnet Inti
ROS	= Reactive Oxygen Species
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
SK	= Skualena
SOD	= Superoksid dismutase
SPSS	= Statistic Program Social Sciences
ter- BHP	= <i>tertier</i> - Butyl Hydroperoxide
TBA	= Thio Barbituric Acid
TBARS	= Thio Barbituric Acid Reactive Substance



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan .....	i
Sampul Dalam .....	ii
Prasyarat Gelar .....	iii
Lembar Pengesahan .....	iv
Penetapan Panitia .....	v
Ucapan terima kasih .....	vi
Ringkasan .....	viii
Abstrak .....	xii
Singkatan .....	xiv
DAFTAR ISI .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xix
DAFTAR TABEL .....	xxi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxiii
SINGKATAN .....	xxiv
Bab 1 Pendahuluan .....	1
1.1 Latar belakang .....	1
1.2 Rumusan masalah .....	7
1.3 Tujuan Penelitian .....	7
1.4 Manfaat Penelitian .....	8
Bab 2 Tinjauan Pustaka .....	9
2.1 Skualena .....	9
2.2 Oksidasi Biologis .....	14
2.3 Radikal bebas .....	16
2.4 Radikal hidroksil .....	19
2.5 Peroksida lemak .....	20
2.6 Malondialdehid .....	21

2.7 Antioksidan .....	22
2.8 Difenil pikril hidrasil . .....	24
2.9 Tinjauan Tentang $\alpha$ - Tokoferol .....	24
2.10 Reaksi radikal bebas dengan antioksidan .....	25
Bab 3 Kerangka Konseptual dan Hipotesis .....	27
3.1 Kerangka Konseptual .....	27
3.2 Hipotesis .....	33
Bab 4 Bahan dan Metode Penelitian .....	34
4.1 Bahan Penelitian .....	34
4.1.1 Bahan dasar .....	34
4.1.2 Bahan kimia .....	34
4.1.3 Bahan percobaan .....	34
4.2 Peralatan .....	35
4.3 Metode Kerja .....	36
4.3.1 Isolasi skualena dan identifikasi .....	36
4.3.1.1 Isolasi Skualena Dengan Metoda AOAC.....	36
4.3.1.2 Identifikasi Skualena .....	37
4.4. Uji aktivitas penangkap radikal bebas Skualena dan $\alpha$ - Tokoferol .....	39
4.4.1 Preparasi Larutan Skualena baku .....	39
4.4.2 Preparasi Larutan Skualena Isolat .....	39
4.4.3 Preparasi Larutan $\alpha$ - Tokoferol .....	39
4.4.4 Preparasi Larutan DPPH.....	40
4.4.5 Cara Kerja Uji Aktivitas Penangkap Radikal Bebas .....	40
4.5 Uji Antiperoksida Lemak Skualena baku; Skualena isolat dan $\alpha$ - Tokoferol pada homogenat hepar tikus dengan induksi t-BHP .....	41
4.5.1 Preparasi homogenat hepar tikus .....	41
4.5.2 Preparasi Larutan Skualena baku dan isolat .....	41



4.5.3 Preparasi Larutan $\alpha$ - Tokoferol .....	42
4.5.4 Preparasi Larutan t- BHP .....	42
4.5.5 Uji Aktivitas Antiperoksida lemak Sk dan $\alpha$ -tokoferol. ...	42
4.6 Analisa Data .....	44
<b>Bab 5 Hasil Penelitian .....</b>	<b>45</b>
5.1 Isolasi dan pemurnian skualena .....	45
5.2 Identifikasi skualena isolat .....	46
5.2.1 Identifikasi dengan KLT .....	46
5.2.2 Identifikasi dengan GC .....	47
5.2.3 Identifikasi dengan GC-MS .....	48
5.2.4 Identifikasi dengan FTIR .....	51
5.2.5 Identifikasi dengan RMI .....	54
5.3 Penentuan panjang gelombang maksimum dan linieritas dari larutan DPPH .....	60
5.4 Hasil uji aktifitas antiradikal bebas DPPH dari skualena baku skualena isolat dan $\alpha$ -tokoferol .....	63
5.4.1 Aktivitas antiradikal bebas DPPH dari skualena isolat ...	63
5.4.2 Aktivitas antiradikal bebas DPPH dari skualena baku .....	65
5.4.3 Aktivitas antiradikal bebas DPPH dari $\alpha$ -tokoferol .....	67
5.4.4 Analisa data % aktivitas antiradikal bebas DPPH .....	68
5.5 Hasil uji aktifitas antiperoksida lemak dari skualena isolat; skualena baku; $\alpha$ -tokoferol .....	70
5.5.1 Linieritas larutan MDA-TBA .....	70
5.6 Analisa data % aktivitas antiperoksida lemak dari skualena isolat;skualena baku; $\alpha$ -tokoferol .....	75
<b>Bab6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>77</b>
6.1 Isolasi dan pemurnian .....	77
6.2 Identifikasi skualena ( isolat ) .....	78
6.3 Uji aktifitas antiradikal bebas DPPH dari skualena baku	

skualena isolat dan $\alpha$ -tokoferol .....	81
6.4 Uji aktifitas antiperoksida lemak dari skualena isolat; skualena baku; $\alpha$ -tokoferol .....	82
Bab 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....	86
7.1 Kesimpulan .....	85
7.2 Saran .....	86
Daftar Pustaka .....	87
Lampiran .....	91

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur dasar Skualen no. regester 0045143-600 .....	10
Gambar 2.2 Struktur isomer skualena no. regester 0045143-207 .....	11
Gambar 2.3 Struktur isomer skualena no. regester 0045143-006 .....	11
Gambar 2.4 Struktur isomer skualena no. regester 0045142-705 .....	12
Gambar 2.5 Struktur isomer skualena no. regester 0045143-504 .....	12
Gambar 2.6 Struktur isomer skualena no. regester 0045143-303 .....	13
Gambar 2.7 Reaksi TBA dan MDA .....	22
Gambar 3.1 Mekanisme Reaksi Penangkapan Atom Hidrogen dari Ikatan Rangkap Skualena Oleh DPPH .....	27
Gambar 3.2 Reaksi Analogi dari Skualen dan Lemak dengan DPPH ....	29
Gambar 3.3 Dugaan pelepasan enam elektron skualena .....	30
Gambar 3.4 Skema Reaksi Berantai Radikal Bebas dengan Asam Lemak Tak Jenuh Hingga Terbentuk MDA Yang dapat dideteksi .....	31
Gambar 3.5 Struktur $\alpha$ - Tokoferol dan Resonansi .....	32
Gambar 5.1 Kromatografi lapisan tipis skualena isolat dan skualena baku dengan fase gerak heksana .....	46
Gambar 5.2 Kromatogram skualena isolat .....	47
Gambar 5.3 Kromatogram skualena baku .....	47
Gambar 5.4 Kromatogram skualena isolat .....	48
Gambar 5.5 Spektrum massa skualena isolat .....	48
Gambar 5.6 Spektrum massa skualena " Library " .....	49
Gambar 5.7 Spektrum infra merah skualena isolat .....	51
Gambar 5.8 Spektrum infra merah skualena baku .....	52
Gambar 5.9 Tumpukan spektra KBr ; skualena baku; skualena isolat ....	53
Gambar 5.10 Spektrum RMI $^1$ H skualena isolat .....	54
Gambar 5.11 Spektrum RMI $^1$ H skualena baku .....	55

Gambar 5.12 Satu unit isoprenil .....	56
Gambar 5.13 Spektrum RMI <sup>13</sup> C skualena isolat .....	57
Gambar 5.14 Spektrum RMI <sup>13</sup> C skualena baku .....	58
Gambar 5.15 Gambaran separo struktur molekul skualena .....	59
Gambar 5.16 Spektra antara panjang gelombang dan absorpsi dari larutan DPPH dalam etanol .....	60
Gambar 5.17 Kurva baku antara larutan DPPH (% b/v) dalam etanol dan absorpsi .....	62
Gambar 5.18 Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena isolat .....	64
Gambar 5.19 Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena baku .....	66
Gambar 5.20 Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh $\alpha$ - Tokoferol.....	67
Gambar 5.21 Kurva antara panjang gelombang dan intensitas warna ....	71
Gambar 5.22 Spektrum intensitas warna dari barbagai kadar TBARS pada $\lambda$ Eks. =539 dan $\lambda$ Em. = 200 - 700 nm .....	72
Gambar 5.23 Kurva baku antara kadar MDA-TBA (TBARS) dan intensitas warna pada $\lambda$ Eks. =539 dan $\lambda$ Em. = 549 nm....	74

## DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Isolasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol .....	45
Tabel 5.2 Hasil fragmentasi dari skualena isolat .....	50
Tabel 5.3 Bilangan gelombang dari skualena isolat dan skualena baku ..	53
Tabel 5.4 Interpretasi Pergeseran Kimia ( $\delta$ ) pada RMI proton .....	56
Tabel 5.5 Interpretasi Pergeseran Kimia ( $\delta$ ) pada RMI $^{13}\text{C}$ .....	59
Tabel 5.6 Hasil absorpsi dari berbagai kadar larutan DPPH dalam etanol ..	61
Tabel 5.7 % Aktivitas antiradikal bebas DPPH spesifik skualena Isolat dalam pelarut etanol diamati pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	63
Tabel 5.8 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena isolat dari 6 kali replikasi (I s/d VI) antara 0,0 - 5,0 jam .....	64
Tabel 5.9 % Aktivitas antiradikal bebas DPPH spesifik skualena baku dalam pelarut etanol diamati pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	65
Tabel 5.10 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena baku dari 6 kali replikasi (I s/d VI) antara 0,0 - 5,0 jam .....	66
Tabel 5.11% Aktivitas antiradikal bebas DPPH spesifik $\alpha$ - Tokoferol dalam pelarut etanol diamati pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	67
Tabel 5.12 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh $\alpha$ - Tokoferol dari 6 kali replikasi (I s/d VI) antara 0,0 - 5,0 jam .....	68
Tabel 5.13 Luas Area Dibawah Kurva dari skualena isolat; skualena baku dan $\alpha$ - Tokoferol dengan kadar yang sama yaitu 1 ppm .....	68
Tabel 5.14 Tabel Anava .....	69
Tabel 5.15 Tabel Perbedaan rata - rata tiap perlakuan .....	69
Tabel 5.16 Hasil Pembacaan Intensitas warna pada $\lambda_{\text{Eks.}} = 539$ dan $\lambda_{\text{Em.}} = 549 \text{ nm}$ .....	73

Tabel 5.17 % Aktifitas Antiperoksida lemak dari skualena isolat; skualena baku dan $\alpha$ - Tokoferol .....	75
Tabel 5.18 Tabel Analisa Varian .....	76
Tabel 5.19 Tabel Perbedaan rata- rata tiap perlakuan .....	76

## DAFTAR LAMPIRAN

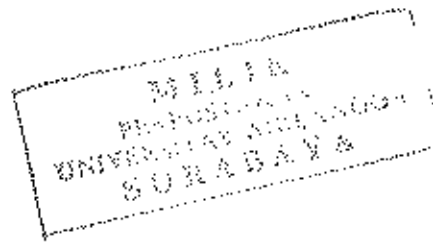
Lampiran 1 Hasil Pengamatan dan perhitungan aktivitas antiradikal bebas DPPH oleh larutan skualena baku dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	91
Lampiran 2 Hasil Pengamatan dan perhitungan aktivitas antiradikal bebas DPPH oleh larutan skualena isolat dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	95
Lampiran 3 Hasil Pengamatan dan perhitungan aktivitas antiradikal bebas DPPH oleh larutan $\alpha$ - Tokoferol dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada $\lambda = 517 \text{ nm}$ .....	99
Lampiran 4 Hasil lima kali pengulangan aktivitas antiperoksida lemak $\alpha$ - Tokoferol dalam homogenat hepar tikus , diamati dengan spektrofluorometer pada $\lambda \text{ Eks.} = 539 \text{ nm}$ dan $\lambda \text{ Em.} = 549 \text{ nm}$ .....	103
Lampiran 5 Hasil lima kali pengulangan aktivitas antiperoksida lemak skualena baku dalam homogenat hepar tikus , diamati dengan spektrofluorometer pada $\lambda \text{ Eks.} = 539 \text{ nm}$ dan $\lambda \text{ Em.} = 549 \text{ nm}$ .....	104
Lampiran 6 Hasil lima kali pengulangan aktivitas antiperoksida lemak skualena isolat dalam homogenat hepar tikus , diamati dengan spektrofluorometer pada $\lambda \text{ Eks.} = 539 \text{ nm}$ dan $\lambda \text{ Em.} = 549 \text{ nm}$ .....	105
Lampiran 3 Komposisi Buffer Fosfat .....	106





## BAB 1

## PENDAHULUAN



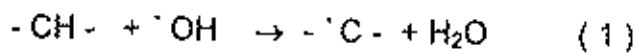
## 1.1. Latar Belakang Masalah.

Akhir-akhir ini, perhatian dunia kesehatan terhadap radikal bebas semakin meningkat. Hal ini disebabkan karena radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan sel yang mendasari berbagai macam keadaan patologis, seperti kanker, penyakit jantung koroner, rematik artritis, penyakit respiratorik, katarak, penyakit hati, serta dicurigai ikut berperan pada proses penuaan dini (Bast Aalt, *et al.*, 1991; Fry, 1988) .

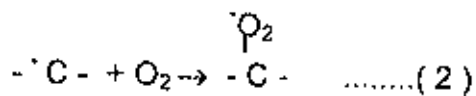
Radikal bebas adalah senyawa yang sangat reaktif. Salah satu bentuk radikal bebas adalah  $\cdot\text{OH}$  (radikal hidroksil) , yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital luarnya, sehingga dapat bereaksi dengan molekul biologis yang bersifat nonradikal , dengan cara mengikat elektron dari molekul tersebut untuk memenuhi orbital luarnya (Bast Aalt, *et al.*, 1991). Akibat dari reaksi tersebut dapat terjadi reaksi rantai yang menghasilkan radikal bebas baru. Oleh karena itu adanya radikal bebas dapat mengganggu integritas komponen-komponen sel, baik komponen struktural maupun komponen fungsional (Sano Mitsuaki, *et al.*, 1995)

Kerusakan membran biologis akibat adanya radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) ditunjukkan oleh terjadinya reaksi rantai yang diketahui sebagai peroksidasi

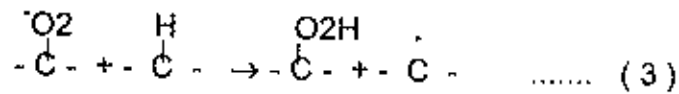
lemak. Hal ini terjadi karena  $\cdot\text{OH}$  menyerang rantai asam lemak tak jenuh seperti asam arakidonat, asam linoleat, asam linolenat pada lapisan membran yang mengandung lemak (fosfolipid, glikolipid). Radikal hidroksil mengambil atom hidrogen dari satu karbon rantai samping dan bergabung dengannya membentuk molekul air ( $\text{H}_2\text{O}$ ) dan membentuk radikal karbon dalam membran (Bast Aalt, *et al.*, 1991; Halliwell, 1991; Rice-Evans, *et al.*, 1991), terlihat pada reaksi sebagai berikut:



Radikal karbon ( $-\dot{\text{C}}-$  atau  $\text{R}^\cdot$ ) dari rantai asam lemak tak jenuh tersebut akan mengalami penyusunan ulang untuk membentuk struktur konjugasi diena, sehingga menghasilkan bermacam-macam asam lemak yang lebih pendek. Bila dua radikal karbon dalam membran bertemu akan terjadi ikatan silang dari rantai samping asam lemak dan dua elektronnya bergabung membentuk ikatan kovalen; hal ini berarti reaksi rantai berhenti. Tetapi secara fisiologi, sebagian besar lemak yang mengandung radikal karbon akan bereaksi dengan oksigen untuk membentuk radikal lain yaitu radikal peroksil yang biasa disebut radikal peroksid (Rice-Evans *et al.*, 1991) hal ini terlihat pada reaksi sebagai berikut :



Radikal peroksil (  $\text{LOO}^\cdot$  ) sangat reaktif menyerang rantai samping asam lemak yang berdekatan dan mengambil atom hidrogen serta membentuk molekul baru lipid hidroperoksida (  $\text{LOOH}$  ) dan radikal karbon baru (Rice-Evans A et al.,1991) ,hal ini terlihat pada reaksi sebagai berikut :



reaksi (2) dan reaksi(3), merupakan reaksi berantai dan berlangsung terus menerus.

Dengan demikian satu radikal hidroksil dapat menyebabkan banyak rantai samping asam lemak tak jenuh dalam membran biologis berubah menjadi lipid hidroperoksid. Fungsi membran akan terganggu bila terjadi pengumpulan  $\text{LOOH}$  serta dapat menyebabkan kerusakan. Lipid hidroperoksida dapat pula menyebabkan pembusukkan sehingga menghasilkan produk yang toksik yaitu aldehida. Sebagian besar peneliti menyebut malondialdehida (MDA). Aldehida dan peroksi radikal juga dapat menyebabkan beberapa kerusakan pada membran protein, inaktifasi reseptor dan ikatan enzim membran (Bast Aalt et al.,1991; Halliwell B,1991; Rice-Evans et al.,1991).

Tubuh manusia secara normal terus-menerus mengalami proses pembentukan radikal bebas melalui peristiwa metabolisme sel misalnya dalam proses perlindungan peradangan, kekurangan nutrisi dan sebagai

respon terhadap adanya radiasi sinar UV serta polusi lingkungan. Sehingga untuk menjaga dan melindungi tubuh memerlukan adanya senyawa tambahan yaitu antioksidan yang dapat menetralkan atau menghambat dampak negatif radikal bebas (Bast Aalt, *et al.* 1991; Halliwell B., 1991). Sebenarnya di dalam tubuh sendiri terdapat antioksidan yang berfungsi melindungi tubuh dari pengaruh negatif radikal bebas, tetapi bila sistem keseimbangan ini terganggu akan menimbulkan suatu penyakit. Untuk mengatasinya, maka diperlukan tambahan antioksidan dari luar ( Bast Aalt, *et al.*, 1991; Halliwell, 1991)

Antioksidan adalah suatu senyawa yang mudah teroksidasi dan mampu menunda atau mencegah terjadinya oksidasi dari substrat serta dapat bersifat sebagai penangkap radikal, peredam singlet oksigen atau penghambat elektron ( Mathiesen Liv *et al.*, 1995). Telah banyak diteliti berbagai macam antioksidan seperti vitamin C,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, katekin dan epikatekin ( yang terdapat dalam daun teh hijau ) dan terbukti secara *in vitro* mempunyai efek biologis sebagai antioksidan. Cara kerja antioksidan tersebut diatas yang merupakan senyawa alami dapat meredam radikal bebas karena kemampuan dari senyawa tersebut memberikan elektron yang diperlukan oleh radikal bebas untuk membentuk elektron yang berpasangan dalam orbital kulit luar sehingga dia tidak reaktif lagi (Kohno Y, *et al.*, 1995)

Skualena adalah senyawa hidrokarbon tak jenuh, dalam struktur molekul tersebut terdapat 6 ikatan rangkap, dengan adanya ikatan rangkap itu maka molekul skualena diduga mampu memberikan elektronnya kepada radikal bebas, hal ini didukung oleh peneliti sebelumnya yang meneliti kemampuan skualena untuk meredam reaksi singlet oksigen dan menangkap radikal bebas, yang dilakukan pada permukaan kulit manusia dengan inisiator sinar ultraviolet (De Luca C. *et al.*, 1996) proses terjadinya pigmentasi akibat lipoperoksidasi oleh jamur pada permukaan kulit (Desai K.N. *et al.*, 1996)

Skualena tidak dapat disintesa di luar tubuh makhluk hidup, senyawa tersebut terdapat tersebar disemua organ dan jaringan dengan berbagai fungsi (Budiarso I.T., 1992). Sumber utamanya adalah minyak hati ikan Hiu Botol yang mengandung skualena antara 70 sampai 88 % (Andriyani, 1995; Retnowati, 1994 ; Suprayitno E, 1995). Ikan tersebut banyak ditangkap oleh para nelayan daerah Sendang Biru Malang Selatan. Mereka mengekstraksi minyak hati ikan Hiu Botol secara tradisional yaitu dengan cara memanaskan hati ikan hiu di bawah sinar matahari atau dengan cara merebusnya. Isolasi skualena menurut Andriyani (1995) dapat diperoleh rendemen yang tinggi (85,88 %) dimurnikan secara super kritik, menggunakan pelarut karbon dioksida cair pada tekanan 4500 psi selama 2 jam. Namun prosedur ini operasionalnya sangat sukar dan biayanya besar.

Pada akhir-akhir ini penggunaan skualena dalam masyarakat sebagai makanan sehat alami ( natural health food ) dan sebagai pelindung kulit dalam kosmetik semakin meningkat karena dipercaya bahwa skualena mampu mencegah dan menyembuhkan berbagai penyakit antara lain penyakit hati, kencing manis, meningkatkan ketahanan daya tubuh ; mencegah kanker serta menjaga kulit dari pengaruh sinar matahari, menjaga kelembaban kulit (Budiarto I.T., 1992).

Dengan mengetahui kenyataan yang telah dilakukan masyarakat terhadap skualena dan peneliti sebelumnya, maka timbul pertanyaan apakah skualena mempunyai aktivitas dapat mencegah dan memperbaiki penyakit yang terkait dengan radikal bebas ? Untuk membuktikan hal tersebut, maka perlu dilakukan uji aktivitas skualena sebagai penangkap radikal bebas secara reaksi kimia dan secara *in vitro* dapat diuji berdasarkan aktivitas antiperoksidanya. Sebagai model radikal bebas dapat digunakan berbagai jenis senyawa, salah satu yang dapat digunakan adalah difenil pikril hidrazil (DPPH). Sedangkan untuk menguji aktivitas antiperoksidanya, sebagai model dapat digunakan lemak homogenat hepar dengan induksi *ter* - Butil Hidroperoksida (*t*-BHP) berdasar parameter pembentukan peroksida lemak dengan pengukuran MDA (Yoshino Kyoji *et al.*, 1991; Joyeux M. *et al.*, 1990).

Hepar merupakan tempat intoksikasi dalam kehidupan , sehingga dalam percobaan ini digunakan homogenat hepar terdiri dari campuran sel yang dihancurkan sampai ketingkat sub-seluler sehingga zat yang diteliti

sebagai antioksidan dapat langsung bereaksi dengan target yang dituju tanpa harus mengalami absorpsi bila dilakukan secara *in vivo* ( Fry R.J.,1988).

$\alpha$ -Tokoferol yang telah diketahui sebagai antioksidan dengan cara melepaskan atom hidrogennya dalam menghambat reaksi akibat radikal bebas pada lemak ( Bast Aalt *et al.*,1991) , hal ini diduga sama dengan yang terjadi pada skualena, maka senyawa tersebut digunakan sebagai pembanding dalam rancangan uji perbandingan aktivitas .

## 1.2. Rumusan masalah

1. Apakah skualena mempunyai aktivitas penangkap radikal bebas dan aktivitas antiperoksida lemak ?
2. Bagaimanakah aktivitas penangkap radikal bebas dan aktivitas antiperoksida skualena bila dibanding dengan  $\alpha$ - tokoferol ?

## 1.3 Tujuan Penelitian

- 1.Menguji aktivitas penangkap radikal bebas terhadap DPPH serta aktivitas antiperoksida lemak homogenat hepar dengan induksi *t*-BHP skualena.
2. Membandingkan aktivitas penangkap radikal bebas skualena dengan  $\alpha$ - tokoferol.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

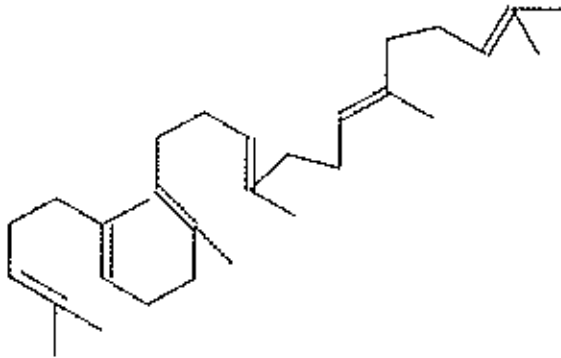
1. Memberikan bukti empiris tentang aktivitas skualena untuk mencegah penyakit akibat oksidan
2. Meningkatkan penggunaan bahan alami sebagai obat alternatif yang lebih murah dan aman serta banyak dipasaran sehingga mudah diperoleh.



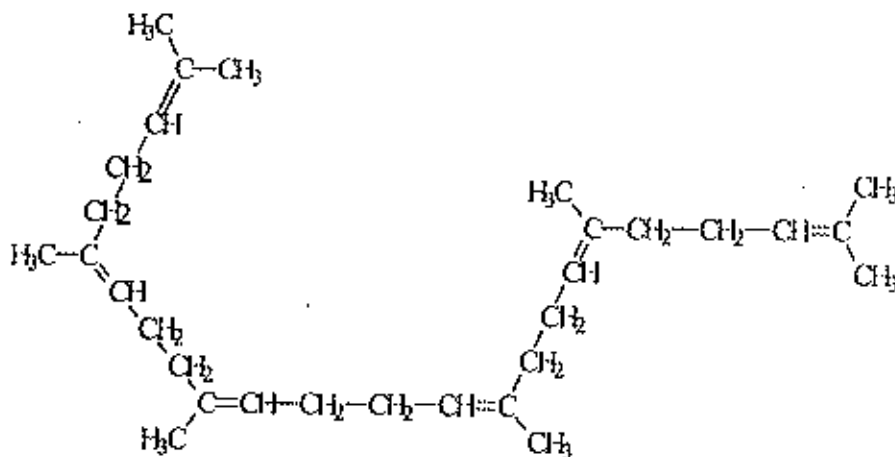




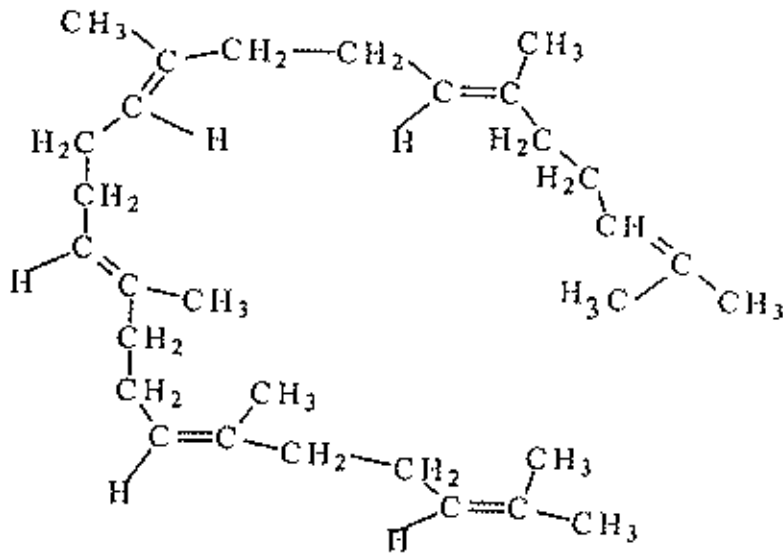
atau



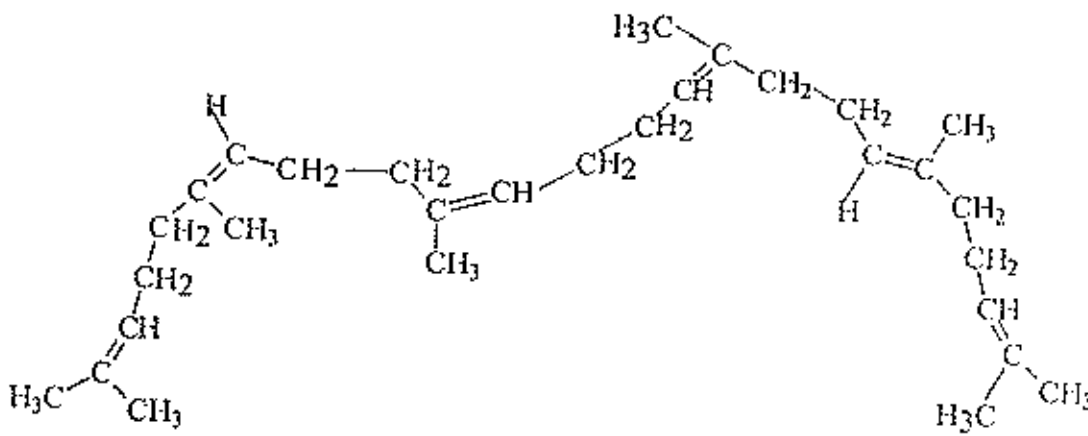
Dalam struktur skualena terdapat beberapa ikatan rangkap , sehingga senyawa tersebut mempunyai beberapa bentuk isomer yaitu sebanyak enam macam, adapun bentuk - bentuk isomernya ( Gambar 2.1 sampai dengan Gambar 2.6 ) adalah sebagai berikut :



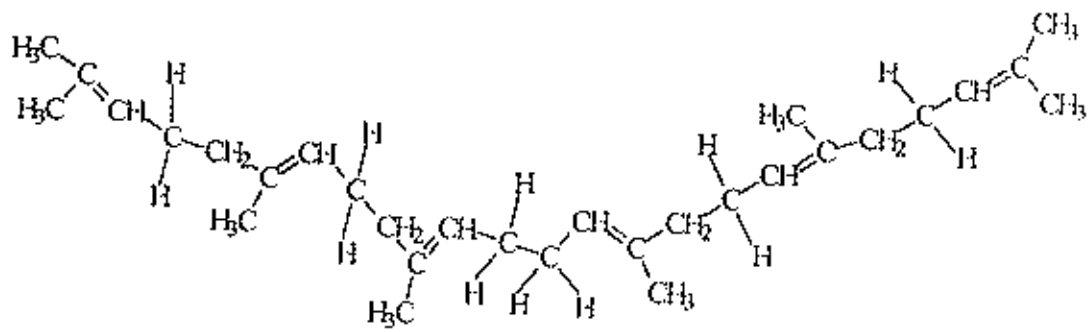
Gambar 2.1 Struktur dasar dari skualena dengan nomer register 0045143-600 ( Info Chem Gesellschaft fur Chemesche Information, Germany)



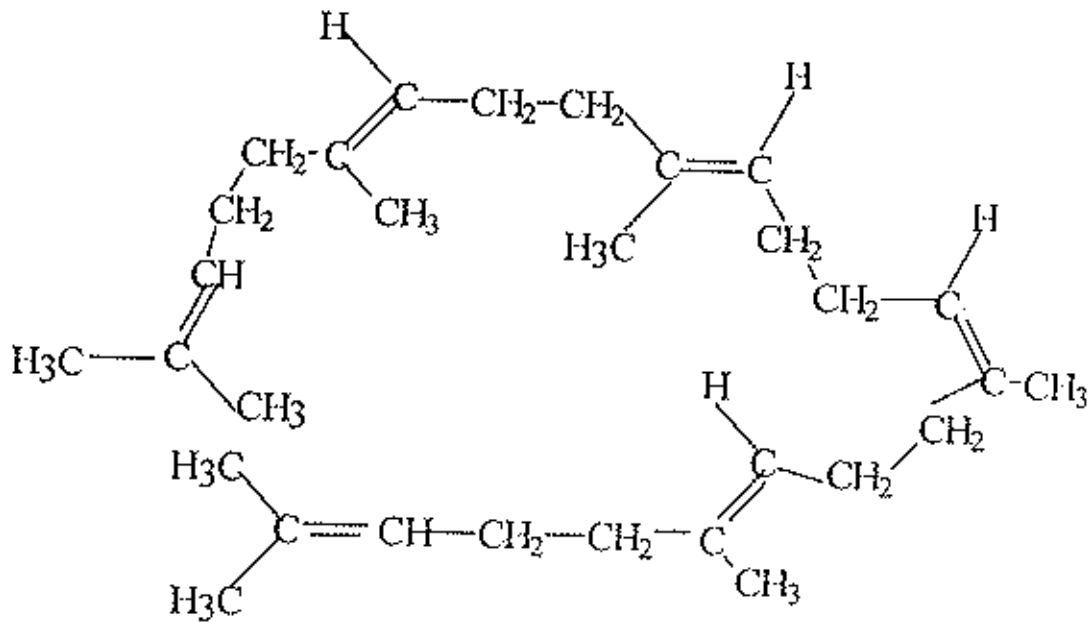
Gambar 2.2 Struktur isomer skualena nomer regester 0045143-207  
(Sen Stephanie E., Prestwich Glenn D., 1989 )



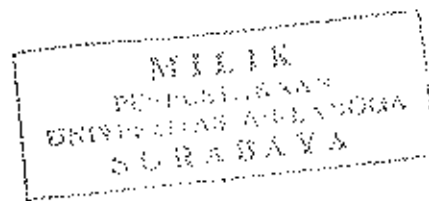
Gambar 2.3 Struktur isomer skualena no. regester 0045143-006  
( Masuyama Yoshiro., Yamada Kohji et all ., 1987 )

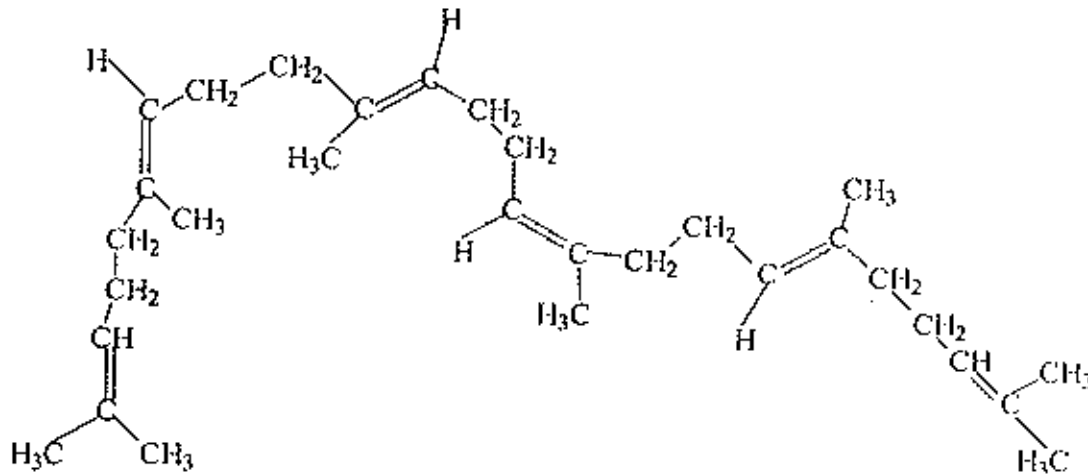


Gambar 2.4 Struktur isomer skualena No. register 0045142-705  
(Marnier Franz-Josef., Gladke Dieter et al., 1988)



Gambar 2.5 Struktur isomer skualena No. register 0045143-504  
( Pill J., Aufenanger J et al., 1987 )





Gambar 2.6 Struktur isomer skualena No. register 0045143-303 (Sasaoka Shin-Inchi ., Yamamoto Taku et all ., 1985 )

Berdasarkan penelitian sebelumnya pemisahan skualena dengan komponen non- lemak lainnya dapat dilakukan secara kromatografi kolom dengan fase diam silika gel atau alumina dan fase gerak petroleum eter atau n- heksana (AOAC,1995; Suprayitno E.,1995).

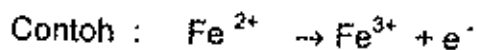
Skualena diketahui mempunyai nilai ekonomi tinggi sebagai bahan kimia yang digunakan dalam industri kosmetik , farmasi terutama obat tradisional dan sebagai bahan makanan sehat alami , industri sutra , prosesiing karet dan sebagai pelumas ( Campagno,1984).

Sebagai bahan makanan sehat alami skualena dipercaya mampu mencegah dan mengobati berbagai penyakit seperti tuberkulose , penyakit kulit , penyakit lambung & usus , radang hati dan luka luar serta diduga dapat mencegah timbulnya kanker( Budiarmo,1992 ). Hal ini karena didalam tubuh

skualena bereaksi dengan air (  $H_2O$  ) membentuk skualana dengan melepaskan oksigen , dimana bila aliran oksigen dalam tubuh lancar akan mengurangi timbulnya penyakit akibat jaringan kekurangan oksigen yang salah satunya adalah penyakit kanker (Budiarso,1992) . Tubuh manusia mengandung skualena yang tersebar disemua organ dan jaringan , dikulit berfungsi sebagai bahan pelembab serta menghaluskan kulit yang terkandung dalam sebum yang dihasilkan oleh kelenjar talk ( sebasius ) juga melindungi kulit dari sengatan matahari ; di hati berfungsi sebagai bahan dasar pembuatan kolesterol dan steroida (Budiarso,1992;Hendrickson, 1980)

## 2.2 Oksidasi biologis

Pengertian oksidasi secara kimia didefinisikan sebagai pengurangan elektron dan reduksi sebagai penambahan elektron. Selanjutnya oksidasi selalu diikuti oleh reduksi dari akseptor elektron. Definisi diatas mencakup lebih banyak reaksi dibanding dengan definisi terdahulu yang mencakup hanya penambahan oksigen atau pelepasan hidrogen (Murray R.K, *et al.*,1990)



Pada reaksi yang menyangkut oksidasi dan reduksi , pertukaran energi bebas sebanding dengan kecenderungan reaktan untuk melepaskan atau menerima elektron. Oksigen adalah zat yang sangat toksik , keracunan oksigen sampai sekarang dihubungkan dengan pembentukan  $H_2O_2$  ; juga

dalam jaringan oksigen direduksi dengan mudah menjadi radikal bebas anion superoksida ( $O_2^{\cdot -}$ ). Superoksida dapat terbentuk selama oksidasi univalen dengan molekul oksigen dalam rantai pernafasan. Bekerjanya superoksida sebagai reduktor dan oksidator, efek kimianya diperbesar oleh *reaksi rantai radikal bebas*. Fungsi superoksida dismutase melindungi organisme aerob terhadap kemungkinan efek superoksida yang merusak. Dalam hal ini antioksidan diperlukan untuk mengikat radikal bebas dan mengurangi toksisitas oksigen (Bast Aalt, *et al.*, 1991; Halliwell B, 1991)

Meskipun oksidan dihasilkan dalam proses biologis normal, kekuatan untuk merubah dan merusak dapat dihambat oleh susunan antioksidan intra dan ekstraseluler yaitu sitoplasma, mitokondria dan bentukan ekstraseluler seperti superoksid dismutase (SOD), katalase dan sistein glutation (GSH), makromolekul seperti seruloplasmin dan transferrin; susunan molekul kecil diantaranya glutation, metionin, vitamin E dan C (Bast Aalt, *et al.*, 1992; Halliwell B., 1992; Tripathi Y.B, *et al.*, 1995)

Dunia kedokteran memberikan perhatian yang besar terhadap oksidan; karena peran oksidan dalam hal patogenesis dari berbagai penyakit. Hubungan antara oksidan dan penyakit pada manusia ditemukan dari tiga sumber yaitu : (a). Diturunkan melalui proses biologis intraseluler normal sebagai perlindungan tubuh, (b). pelepasan oleh sel radang kelingkungannya dan (c) turunan kedua xenobiotik, sebab xenobiotik termasuk oksidan (Bast Aalt, *et al.*, 1991; Fry R.J., 1988).



Mekanisme oksidan menyebabkan kerusakan sangat kompleks , sebab daya tarik untuk menerima elektron dari molekul target dan oksidan dapat merubah ( modifikasi ) struktur dan fungsi molekul - molekul target hal ini terjadi bila keseimbangan reaksi redoks dalam tubuh tak seimbang . Hal ini mengarahkan bahwa oksidan merusak sel karena berinteraksi dengan komponen struktural dan fungsional sel target tanpa hambatan .

### 2.3 Radikal bebas

Elektron dalam atom menempati suatu daerah atau ruangan yang diketahui sebagai orbital . Masing - masing orbital dapat ditempati maksimum dua elektron (berpasangan) yang saling berlawanan arah; karena elektronnya berpasangan dan berlawanan arah membuat molekul tersebut lebih stabil ( nonradikal ) (Rice-Evans a. Catherine, *et al.*,1991).

**Radikal bebas** dapat didefinisikan sebagai spesies yang keberadaannya independen dan mempunyai satu atau lebih elektron **tak berpasangan** , kerena elektronnya sendirian radikal bebas menjadi lebih reaktif dari nonradikal dan cenderung untuk mencari elektron guna membentuk pasangannya ( Halliwell Barry,1991; Pine, *et al.* 1988)

Reaksi radikal bebas dan nonradikal menurut Bast Aalt, *et al.* (1991) ada 3 cara yaitu :

1. Radikal memberikan elektron tanpa pasangan ke nonradikal ( reduktor radikal ).

2. Radikal mengambil elektron nonradikal ( oksidasidator radikal )
3. Radikal bergabung dengan nonradikal.

Dari ketiga tipe reaksi tersebut menyebabkan spesies nonradikal menjadi radikal , hal ini merupakan ciri - ciri dari reaksi radikal bebas dengan nonradikal cenderung membentuk reaksi rantai .

Dari ketiga tipe reaksi tersebut menyebabkan spesies nonradikal menjadi radikal , hal ini merupakan ciri - ciri dari reaksi radikal bebas dengan nonradikal cenderung membentuk reaksi rantai .

Ciri - ciri reaksi radikal bebas ada 3 macam yaitu ( Pine et al., 1988)

- a. Tahap permulaan pembentukan / inisiasi.

Pada tahap ini ada dua cara yang lazim yaitu :

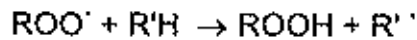
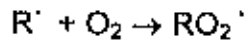
1. Melalui pemutusan secara homolisis :  $R - R \rightarrow R^{\cdot} + R^{\cdot}$

$X^{\cdot}$

2. Reaksi molekul dengan radikal bebas lain :  $R - R \xrightarrow{X^{\cdot}} R^{\cdot} + R^{\cdot}$

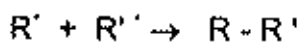
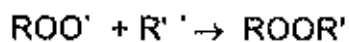
Pemisahan ikatan sigma secara homolisis terjadi pada suhu yang sangat tinggi atau cahaya (fotolisis) . Inisiator adalah zat apa saja yang dapat mengawali terjadinya reaksi radikal bebas; dalam reaksi kimia yang berperan sebagai inisiator adalah cahaya , panas , peroksida organik , peroksida logam . Zat yang dapat menghambat kerja inisiator disebut antioksidan.

b. Tahap pemanjangan / propagasi yaitu reaksi radikal dan nonradikal



Tahap ini merupakan tahap reaksi rantai yang sebenarnya ; dimana satu radikal dapat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal baru  $ROO^{\cdot}$  yang disebut radikal peroksida. Radikal tersebut dapat bereaksi dengan nonradikal membentuk peroksida dan radikal baru, radikal baru yang terbentuk dapat bereaksi dengan satu molekul oksigen dan membentuk radikal peroksida lagi reaksi ini akan terus terjadi.

c. Tahap penghentian / terminasi



Pada reaksi akhir ini terjadi bila dua radikal bebas bertemu sehingga keduanya bergabung membentuk ikatan kovalen dengan 2 elektron milik bersama dan menyebabkan molekul tersebut tidak reaktif lagi.

Oksigen merupakan suatu diradikal stabil sehingga merupakan penyebab terjadinya reaksi oksidasi ; terutama oksigen diudara menyebabkan terjadinya otooksidasi pada lemak dengan ikatan tak jenuh.

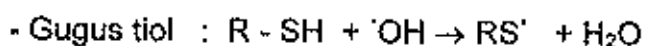
## 2.4 Radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ )

Ahli kimia dan biologi telah meneliti dengan seksama peranan reaksi radikal bebas dalam merusak sel hidup akibat adanya radiasi dengan energi tinggi. Bila jaringan terkena radiasi sinar gamma ; semua energi akan diserap oleh air sel ; sebab sebagian besar komposisi sel terdiri dari air. Radiasi menyebabkan ikatan kovalen oksigen - hidrogen dari air terputus dengan membentuk  $\text{H}\cdot$  dan  $\cdot\text{OH}$  yang merupakan radikal.

Radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) diketahui sebagai radikal yang sangat reaktif serta dapat menyerang dan merusak hampir setiap molekul yang ditemui dalam sel hidup secara cepat. Reaksi antara  $\cdot\text{OH}$  dengan molekul biologi yang bersifat nonradikal dapat menyebabkan reaksi rantai.

Molekul biologi yang dapat diserang oleh radikal  $\cdot\text{OH}$  adalah sebagai berikut ( Bast et al , 1991 ) :

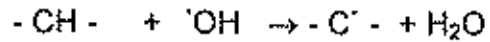
### 1. Radikal hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) mengambil 'H' dari :



Dari reaksi tersebut menghasilkan radikal sulfur ( radikal tiil ) dapat bereaksi dengan oksigen membentuk radikal oksisulfur (  $\text{RSO}_2\cdot$  dan  $\text{RSO}\cdot$  ) yang dapat merusak moleku biologi; sebagai contoh turunan

obat penisillamin yang mengandung radikal sulfur dapat menyerang serta merusak protein tertentu.

- Rantai samping asam tak jenuh



Ciri khas kerusakan yang disebabkan oleh  $\cdot OH$  ditandai dengan terjadinya reaksi rantai dari rantai samping asam lemak yang diketahui sebagai peroksida lemak ( Gambar 3.2).

2. Radikal hidroksil menyerang purin dan pirimidin sebagai dasar dari DNA

## 2.5 Peroksidasi lemak

Membran lemak terdiri dari fosfolipid , glikolipid dan sterol - kolesterol pada membran mamalia . Dari 2 golongan utama fosfolipid yang terdapat pada membran , fosfogliserida adalah yang lebih utama dan terdiri dari rangka gliserol dimana terikat 2 asam lemak dalam ikatan ester dan alkohol terfosforilasi.

Bagian asam lemaknya ada yang bersifat jenuh dan asam lemak tidak jenuh ; dimana asam lemak tak jenuh terdiri dari asam linolenat , asam lenoleat dan asam arachidonat relatif tidak stabil ; mudah rusak akibat terjadinya oksidasi .

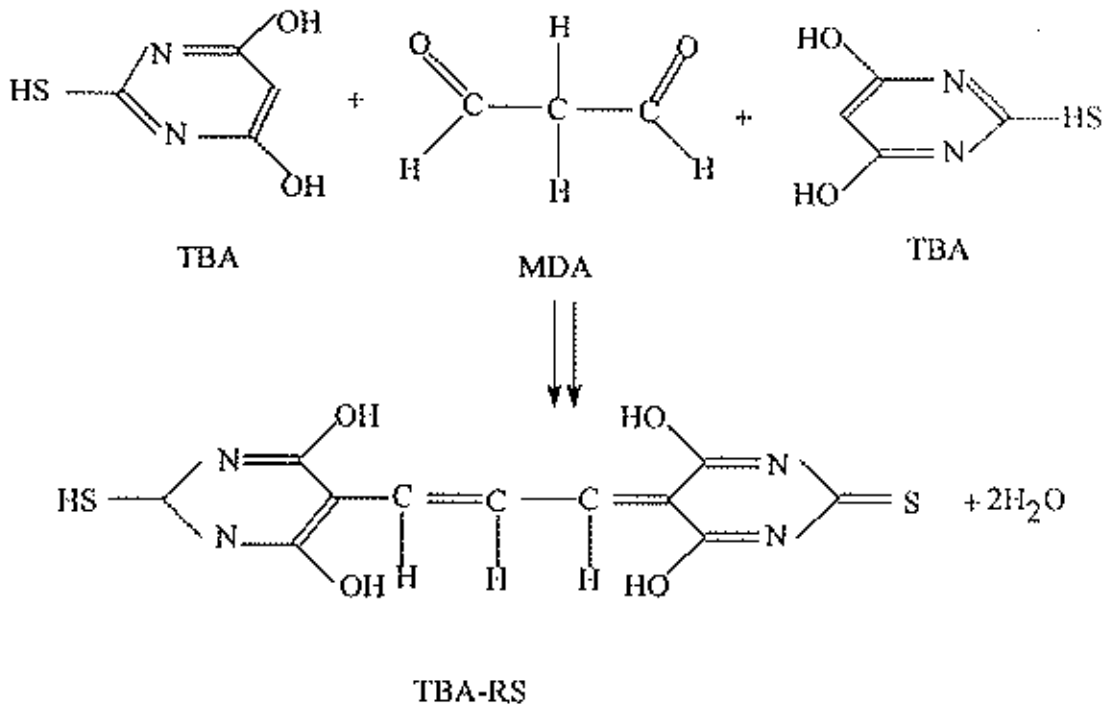
Oksidasi pada rantai asam lemak tak jenuh terjadi pada ikatan rangkapnya akan menghasilkan berbagai macam molekul dengan rantai

karbon yang lebih pendek antara lain asam - asam lemak dengan rantai karbon lebih pendek ; aldehid dan keton. Hasil reaksi ini yang dapat menyebabkan berubahnya permeabilitas ; merubah fluiditas serta berpengaruh pada ikatan antara enzim - membran dan bersifat toksik terhadap tubuh sehingga menimbulkan berbagai keadaan patologis .

## 2.6 Malondialdehid ( MDA )

Malondialdehid merupakan hasil dari peroksidasi asam lemak  $n - 6$  ( linoleat ,  $\gamma$  linoleat dan asam arakidonat ) dan  $n - 3$  (  $\alpha$  linoleat dan asam dokosaheksaenolat ) yang terdiri dari tiga karbon ( dialdehid ) bersifat sangat reaktif . Tetapi dapat juga merupakan turunan dari hasil hidrolisis pentosa ; deoxyribosa ; heksosa ; dari beberapa asam amino dan DNA . MDA sering diukur kadarnya menggunakan reaksi dengan asam tiobarbiturat ( TBA test ).

Dalam reaksi secara Stoichiometri satu molekul MDA bereaksi dengan dua molekul asam 2- tiobarbiturat dan reaksi terjadi pada pH 2 - 3 . Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut lihat gambar 2.7. Hasil reaksi ini dapat diamati dengan spektrofotometer dengan  $\lambda = 532 - 535$  nm dan bisa juga digunakan spektrofluorometer pada  $\lambda$  emisi = 549 nm dan  $\lambda$  eksitasi = 539 nm. ( Rice-Evans et all , 1991 )



Gambar 2.7 Reaksi TBA dan MDA

## 2.7 Antioksidan

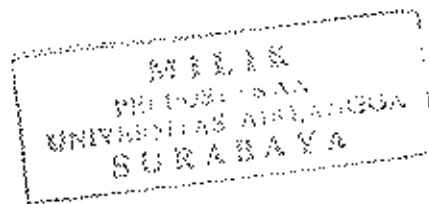
Antioksidan adalah senyawa bersifat mudah teroksidasi yang dapat menunda atau mencegah terjadinya oksidasi dari suatu substrat (Halliwell B., 1991). Substrat yang mudah teroksidasi dalam sel hidup adalah protein, lemak, karbohidrat dan DNA. Secara normal dalam tubuh terdapat antioksidan seperti GSH ( Glutation) ; SOD (Superoksid Dismutase) ; vit. E , tetapi bila keseimbangan sistem oksidasi - reduksi dalam tubuh terganggu maka perlu penambahan antioksidan dari luar guna menanggulangi timbulnya keadaan patologis ( Halliwell B., 1991).

Secara garis besar cara kerja antioksidan ada tiga cara yaitu (Halliwell B., 1991) :

1. Mencegah atau menghambat terjadinya peroksida lemak.
2. Menangkap (Scavenge) spesies oksigen reaktif (ROS).
3. Memperbaiki kerusakan akibat ROS ( superoksid anion radikal, hidroksil radikal, peroksil radikal )

Antioksidan yang berasal dari bahan - bahan alam sekarang banyak digunakan karena tidak menimbulkan efek samping dan lebih aman dibanding antioksidan sintetik yang biasanya merupakan turunan dari fenol. Antioksidan alami yang sudah diuji antara lain : Vit. E ; Vit. C ;  $\beta$  karoten ; sesamol ; katekin ; EGC (Epigallocatekin) , senyawa - senyawa tersebut dapat *mencegah* terjadinya oksidasi dari asam lemak tak jenuh akibat oksidan / radikal bebas dengan jalan mencegah pengambilan atom hidrogen dari lipid dan mereka dapat memberikan atom hidrogennya pada radikal bebas tersebut( Wijaya Andi, 1996., Yoshino Kyoyi et al., 1994).

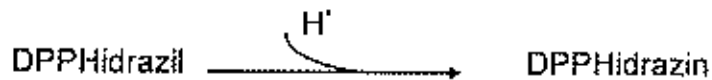
Dalam penelitian ini digunakan skualena yang mempunyai 6 ikatan rangkap yang diduga mampu memberikan atom hidrogennya pada radikal bebas (Gambar 3.1 sampai dengan Gambar 3.3 ) membentuk radikal skualena dan bereaksi dengan oksigen membentuk monoperoksida skualena dan skualena mempunyai 6 ikatan rangkap , sehingga mempunyai aktivitas antiradikal yang besar karena mampu melepas 6 atom hidrogennya.





## 2.8 Difenil Pikril Hidrazil (DPPH)

Difenil Pikril Hidrazil ( $C_{18}H_{12}N_5O_6$ ): Serbuk berwarna hijau, BM = 394,33 sebagai radikal bebas yang stabil, reaktifitasnya meningkat bila berdekatan dengan radikal lainnya dibanding dengan molekul yang bersifat netral ( Sykes Peter, 1975 ). DPPH larut dalam etanol dan metanol, bila dilarutkan dalam alkohol atau metanol akan berwarna ungu (purple) dan apabila bereaksi dengan senyawa antiradikal, maka warna larutan akan memucat. Perubahan ini dapat diamati pada  $\lambda = 517\text{nm}$  menggunakan spektrofotometer. Reaksi dapat dilihat pada gambar 3.1.



## 2.9 $\alpha$ -Tokoferol

Vitamin E adalah merupakan campuran tokoferol yang larut lemak yaitu  $\alpha$ ,  $\delta$  dan  $\gamma$  tokoferol . Diantara ketiganya  $\alpha$ - tokoferol yang paling aktif menangkap peroksil radikal dengan memberikan atom hidrogennya sehingga dia menjadi bentuk radikal baru yang bersifat lebih stabil karena terjadi delokalisasi elektron yang tidak berpasangan ( posisi elektron yang lebih stabil pada Gambar 3.5 adalah yang ke V dari beberapa bentuk resonansinya ) . Adanya resonansi elektron dalam radikal  $\alpha$ - tokoferol ini menyebabkan molekul tersebut bersifat kurang aktif dibanding  $\text{LOO}^{\bullet}$

(peroksida lemak). Struktur dan terjadinya resonansi elektron pada radikal  $\alpha$ - tokoferol dapat dilihat pada Gambar 3.5.

Gambaran reaksi dari  $\alpha$ - tokoferol yang melepas atom hidrogennya dan cara penangkapan radikal lemak ( $LOO^{\cdot}$ ) sehingga dapat menghentikan reaksi perpanjangan yang terjadi pada lemak tak jenuh :



Banyak penelitian sudah dilakukan dengan menggunakan  $\alpha$ - tokoferol sebagai kontrol positif maupun pembanding karena sudah diketahui potensinya sebagai antioksidan dan dalam penelitian ini digunakan sebagai pembanding dari skualena.

## 2.10 Reaksi radikal bebas dengan antioksidan

Untuk mencegah terjadinya reaksi rantai akibat adanya radikal bebas yang menyerang membran sel terutama lapisan lemak, maka perlu adanya antioksidan seperti telah diterangkan diawal bab ini.

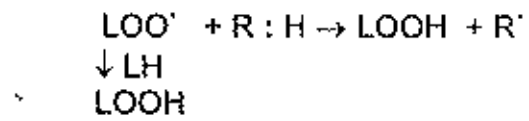
Tahapan reaksi antara radikal bebas dan antioksidan ada 2 macam yaitu :

1. Antioksidan bereaksi dengan radikal bebas sebelum radikal tersebut



2. Antioksidan mencegah terjadinya reaksi rantai ( Scavenger ) antara lemak tak jenuh dan radikal bebas.  $L:H + X^{\cdot} \rightarrow L^{\cdot} + X:H$





Dengan adanya RH ( antioksidan ), peroksid radikal ( LOO<sup>·</sup> ) tidak akan mengambil hidrogen dari lemak tak jenuh ( LH ) tetapi mengambil dari antioksidan sehingga reaksi rantai berhenti.



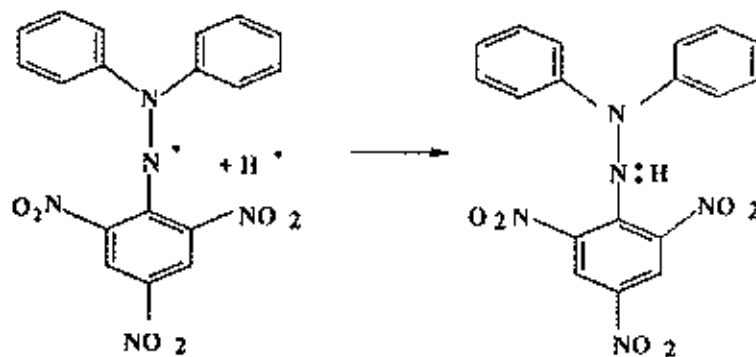
### BAB 3

## KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Konseptual

Skualena mempunyai enam ikatan rangkap dan bentuk cabang pada ikatan rangkap tersebut sehingga dianggap sebagai bentuk tersier, diduga masing - masing mampu melepaskan satu elektron berupa atom hidrogen, sehingga satu molekul skualena dapat melepas enam atom hidrogen atau enam elektron ( Gambar 3.3 ).

Difenil Pikril Hidrazil merupakan salah satu model senyawa radikal bebas yang mempunyai satu elektron tak berpasangan ; senyawa



Difenil pikril hidrazil

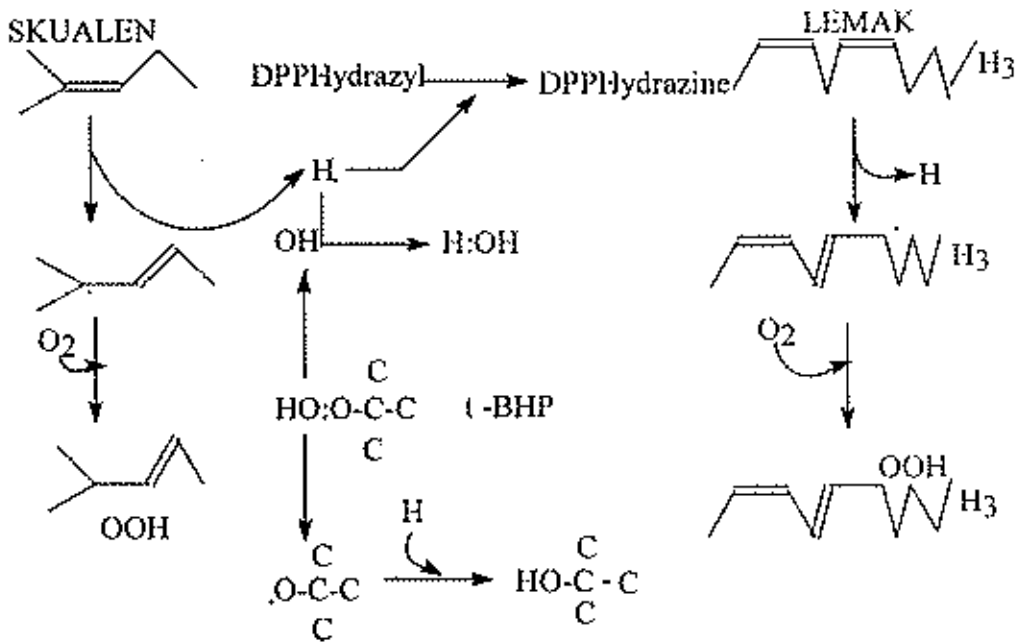
Difenil pikril hidrazin

Gambar 3.1 Mekanisme reaksi penangkapan atom hidrogen berasal dari ikatan rangkap skualena oleh difenil pikril hidrazil

tersebut digunakan untuk menguji aktivitas skualena sebagai penangkap radikal bebas dan menggunakan  $\alpha$ -tokoferol sebagai pembanding antiradikal bebas ( Gambar 3.1).

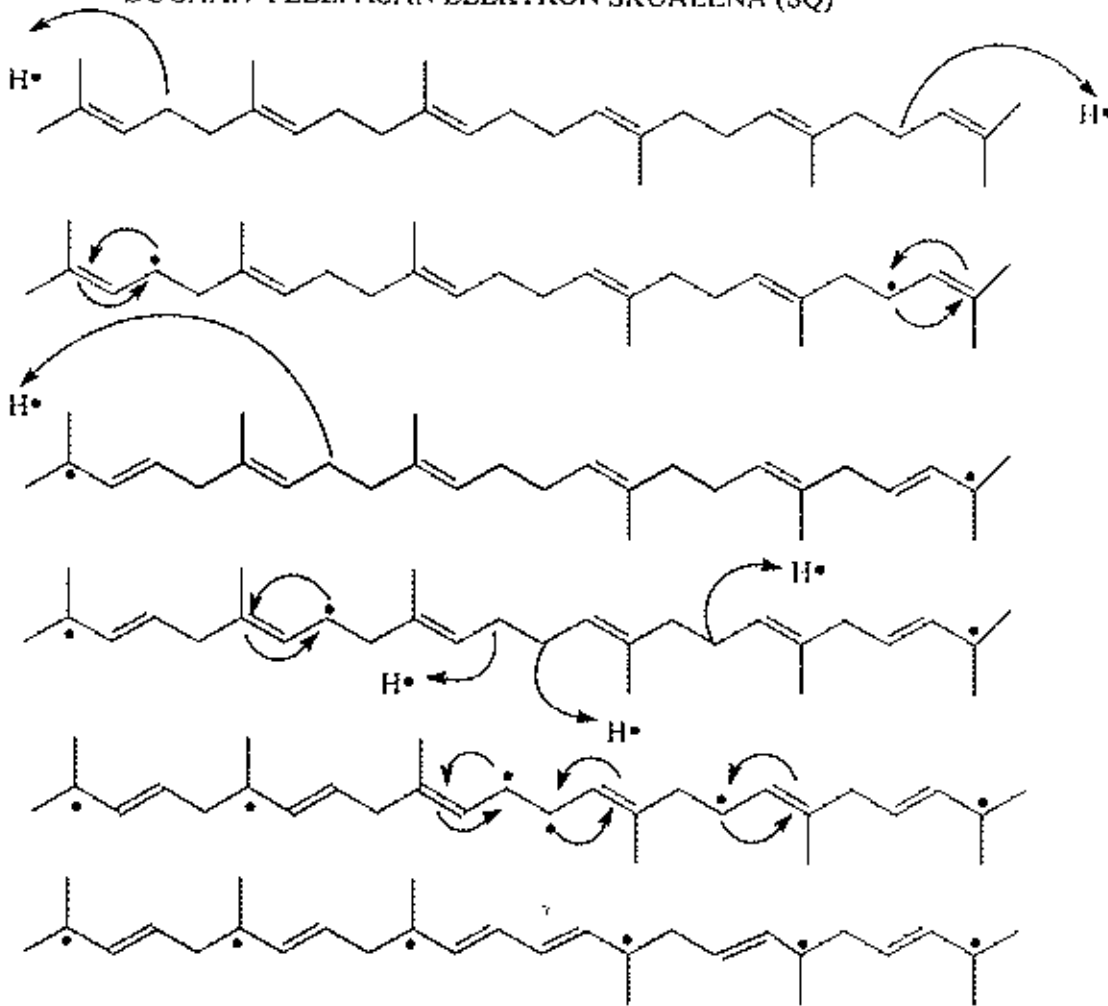
$\alpha$ -Tokoferol digunakan sebagai pembanding karena sudah diketahui aktivitasnya sebagai antioksidan alamiah. Satu molekul  $\alpha$ -tokoferol hanya mampu melepas satu elektron yang berasal dari gugus fenolnya dan molekul radikalnya mampu membentuk lima macam resonansi (Gambar 3.5).

Untuk menguji aktivitas antiperoksida lemak dari skualena digunakan media homogenat hepar tikus putih dimana dalam media tersebut mengandung asam lemak tak jenuh yang berasal dari membran sel. Asam lemak tak jenuh merupakan sasaran dari radikal hidroksil yang berasal dari t-BHP ( Gambar 3.2 ) untuk mengambil elektronnya berupa atom hidrogen , sehingga membentuk molekul air (  $H_2O$  ) yang bersifat netral dan membentuk radikal asam lemak ( Gambar 3.4 ). Reaksi rantai ini akan terus berjalan sehingga rantai samping dari molekul lemak akan terpotong - potong menjadi molekul dengan rantai karbon lebih kecil antara lain molekul malonaldehid (MDA). Dengan adanya skualena ataupun  $\alpha$  - tokoferol yang mampu melepas atom hidrogennya, sehingga menghambat terjadinya reaksi rantai yang merupakan ciri khas dari reaksi radikal hidroksil ( Gambar 3.4 ). Hal ini tercermin dari penurunan pembentukan malonaldehid dan dapat dilihat dari penurunan intensitas warna reaksi antara MDA dan asam tio barbiturat ( Gambar 3.4 dan Gambar 2.7 ) .



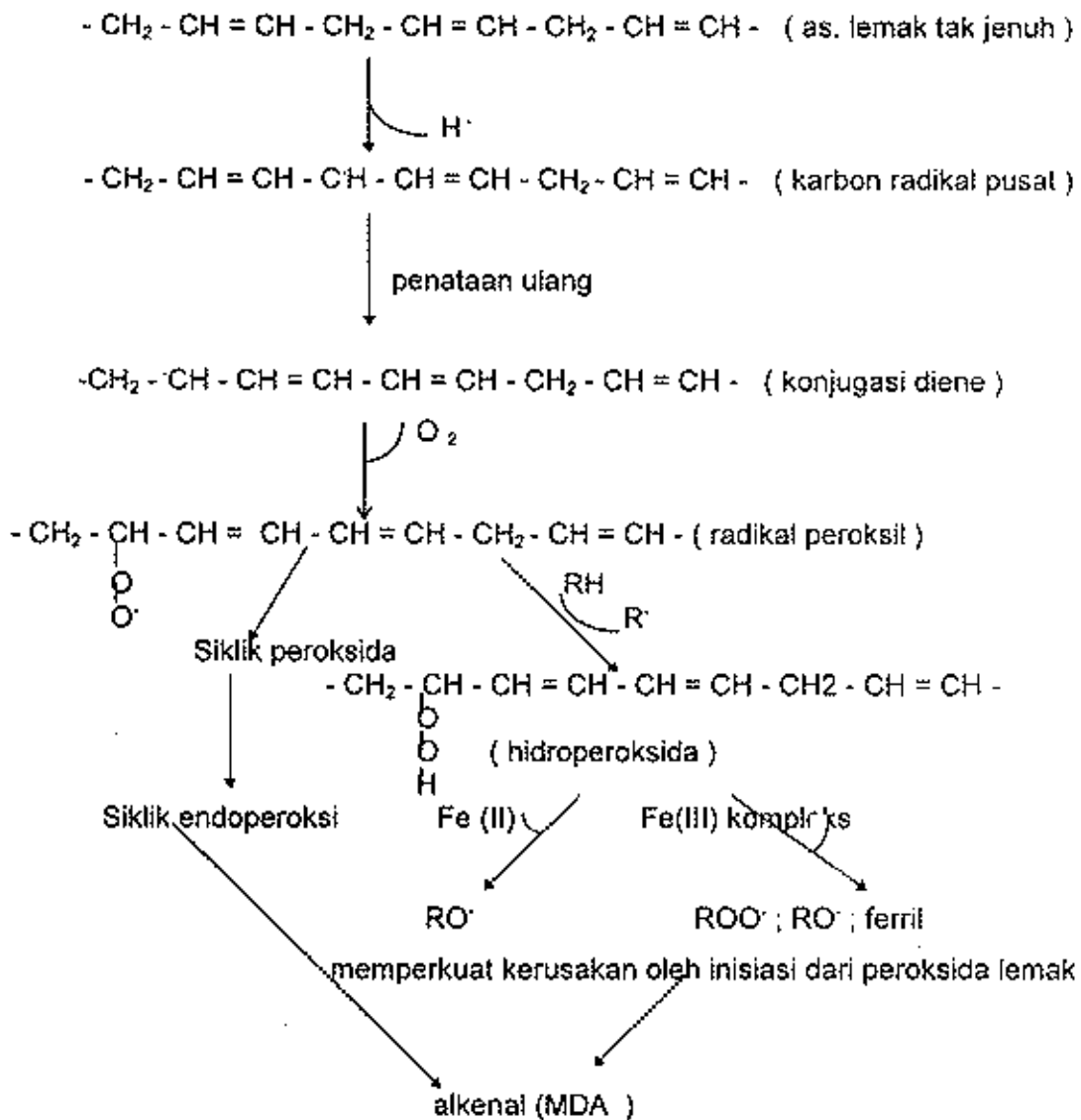
Gambar 3.2. Reaksi analogi dari satu ikatan rangkap squalen dan lemak dengan DPPH atau radikal bebas OH yang berasal dari t-BHP

## DUGAAN PELEPASAN ELEKTRON SKUALENA (SQ)



Gambar 3.3 Dugaan Pelepasan Elektron skualena

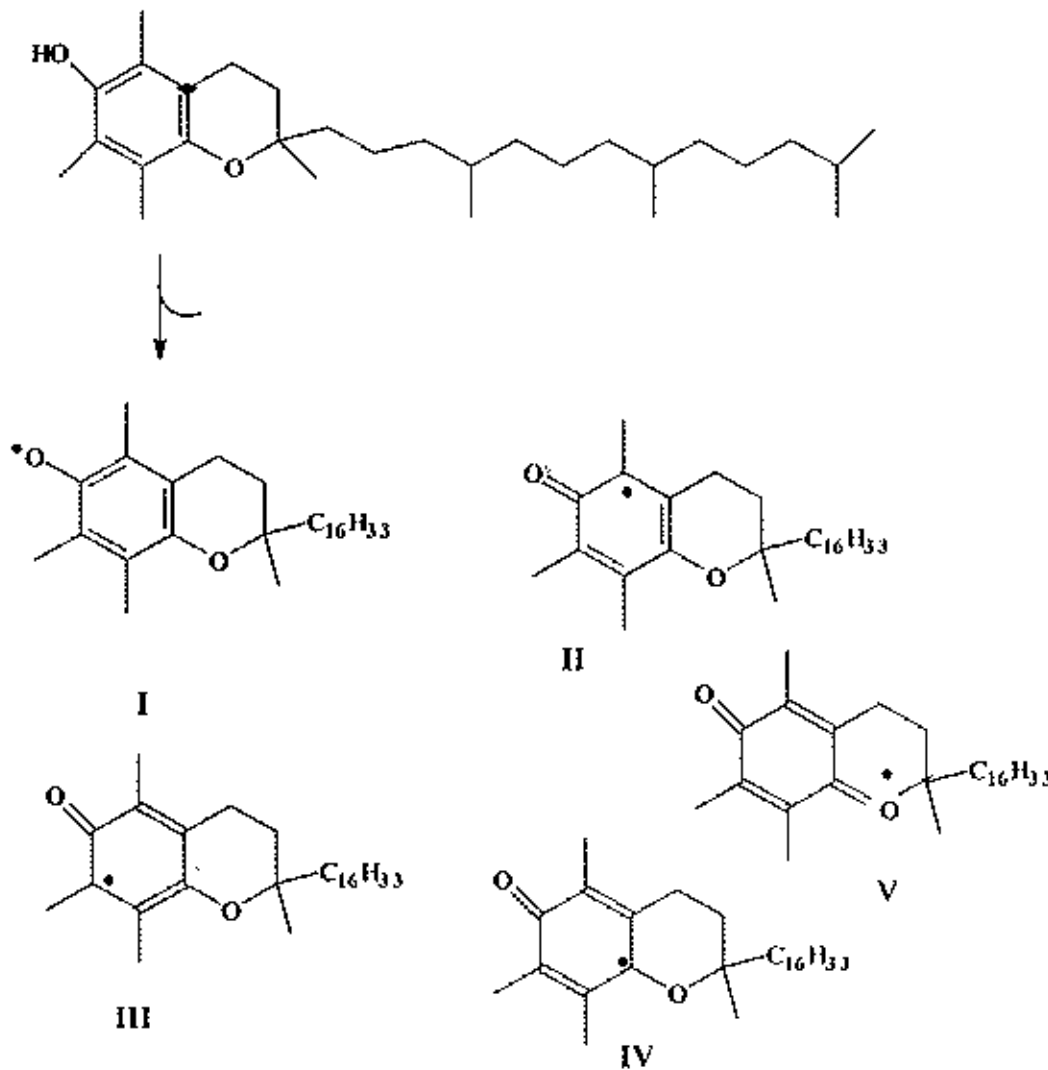




Gambar 3.4 Skema reaksi berantai radikal bebas dengan asam lemak tak jenuh hingga terbentuk MDA yang bisa terdeteksi (Rice-Evans A, et al., 1991)

$\alpha$  - Tokoferol mempunyai gugus fenol yang mampu melepaskan atom hidrogen bebasnya sebagai elektron yang akan ditangkap oleh radikal bebas

( Gambar 3.2 ) dan mempunyai bentuk resonansi radikalnya yang stabil ada lima macam ( Gambar 3.5) sebagai berikut :



Gambar 3.5 Struktur dan resonansi dari  $\alpha$  - tokoferol (Bast, et al. ,1991)

Berdasarkan kemampuan skualena melepas enam atom hidrogen (Gambar 3.3) maka diduga skualena mempunyai aktivitas lebih besar dari  $\alpha$ -

tokoferol ( Gambar 3.5) yang hanya dapat melepaskan satu atom hidrogennya (Kohno Y, *et al.*,1995, Desai K.N, *et al.*,1996)

Untuk membuktikan bahwa skualena juga bersifat sebagai penangkap radikal bebas dalam biomembran yang salah satunya adalah aktivitas antiperoksida lemak , maka dilakukan penelitian dengan induksi *ter*-butil hidroperoksida(*t*-BHP) dalam homogenat hepar dibanding dengan  $\alpha$ -tokoferol ( Gambar 3.2).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Skualena mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas lebih besar dibanding  $\alpha$ -tokoferol.
2. Skualena mempunyai aktivitas antiperoksida lemak lebih besar dibanding  $\alpha$ -tokoferol.

Agar hipotesis penelitian tersebut dapat diamati dan diuji, maka perlu dirumuskan hipotesis kerja sebagai berikut :

1. Penurunan intensitas warna larutan radikal bebas Difenil Pikril Hidrazil ( DPPH ) yang disebabkan karena penambahan skualena lebih besar dari pada penambahan  $\alpha$ -tokoferol.
2. Pembentukan peroksida lemak yang ditunjukkan dengan menurunnya kadar MDA yang terbentuk oleh induksi *ter*- Butil Hidroperoksida (*t*-BHP) karena penambahan skualena lebih besar dari pada penambahan  $\alpha$ -tokoferol.



**BAB 4****BAHAN DAN METODE PENELITIAN****4.1 Bahan Penelitian****4.1.1 Bahan dasar**

Minyak hati ikan Hiu Botol diperoleh dari nelayan Pantai Sendang Biru Malang Selatan sebagai bahan dasar untuk isolasi skualena.

**4.1.2 Bahan kimia**

Jika tidak disebutkan lain maka semua bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini dengan tingkat kemurnian pro analisis:

- |                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| (a) Skualena ( Sigma )             | (g) Heksana ( E. Merck )            |
| (b) DPPH ( Sigma )                 | (h) Etanol ( E. Merck )             |
| (c) $\alpha$ - Tokoferol ( Sigma ) | (i) KOH ( E. Merck )                |
| (d) t-BHP ( Sigma )                | (j) n- Butanol ( E. Merck )         |
| (e) TBA (Sigma )                   | (k) Asam asetat glasial ( E. Merck) |
| (f) SDS ( Sigma )                  | (l) HCl ( E. Merck )                |
| (m) Gas Nitrogen                   | (n) Plat KLT G 254 F( E. Merck )    |
| (o) Fiorisil F - 9127 ( Sigma )    |                                     |

**4.1.3 Bahan Percobaan**

Homogenat hepar dibuat dari hepar tikus putih Strain Wistar dengan jenis kelamin jantan.

## 4.2 Peralatan.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi 4 kelompok :

1. Peralatan untuk isolasi dan identifikasi skualena dari minyak hati

ikan Hiu Botol terdiri dari :

(a) Direct Reading Micro Balance Lm-20 ( Shimadzu )

(b) Alat-alat gelas ( Pyrex )

(c) Rotavapor

(d) FTIR (Jasco FT/IR - 5300 )

(e) GCMS ( Jeol )

(f) RMI ( Hitachi R-1900)

(g) GC ( GC-380, GL Sciences)

(h) Electronic Balance Ex-200A ( Shimadzu )

2. Peralatan untuk uji aktivitas antiradikal terdiri dari :

(a) Alat- alat gelas ( Pyrex )

(b) Spektrofotometer ( Shimadzu UV-VIS-NIR - 365 )

3. Peralatan untuk pembuatan homogenat hepar terdiri dari :

(a) Alat-alat gelas ( Pyrex )

(b) Spuit injeksi 1 ml ( Sciva )

(c) gunting operasi, pinset, kanula

4. Peralatan untuk uji aktivitas antiperoksida lemak terdiri dari :

(a) Alat-alat gelas (Pyrex )

- (b) vortex
- (c) penangas air
- (d) Spektrofluorometer ( Hitachi F - 4000 )

### **4.3 Metode Penelitian**

#### **4.3.1 Isolasi dan identifikasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Botol**

##### **4.3.1.1 Isolasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Botol ( AOAC,1995)**

Ditimbang teliti  $\pm 5$  g minyak hati ikan Hiu Botol dimasukkan kedalam labu alas bulat 125 ml, kemudian ditambahkan berturut - turut 3 ml KOH pekat ( 60g KOH dilarutkan dalam 40 ml aquades) dan 20 ml etanol , kemudian direfluk selama 30 menit. Dalam keadaan masih hangat ditambahkan 50 ml heksana, kemudian larutan dipindahkan dalam corong pisah 125 ml (I), labu alas bulat dicuci dengan campuran 20 ml etanol dan 40 ml aquades, cairan cucian labu dicampur dalam corong pisah(I). Seterusnya corong pisah dikocok baik-baik kemudian dibiarkan cairan memisah. Fase heksana dituang kedalam corong pisah 125 ml (II) yang berisi 20 ml air. Fase air dalam corong pisah(I) dibilas dengan heksana 50 ml dikocok , dibiarkan terpisah , campur fase heksana yang diperoleh dalam corong pisah (II). Corong pisah (II) dikocok baik - baik, dibiarkan terpisah. Fase air dibuang dan fase heksana yang tinggal dicuci dengan 20ml KOH encer (28g KOH tambah aquades sampai 1

liter), fase air dibuang. Fase heksana dicuci lagi dengan air sampai bebas basa. Fase heksana adalah merupakan ekstrak skualena kasar diuapkan dengan rotavapor sampai tidak menetes lagi heksananya. Residu yang diperoleh dimurnikan dengan cara dimasukkan kedalam kolom yang berisi serbuk Florisil F-9127 ( Sigma ) dengan derajat kehalusan mesh 60-100/PR kemudian dielus dengan heksana, wadah skualena kasar dicuci dengan heksana dan bilasan dimasukkan kolom, aliri terus dengan heksana sampai diperoleh larutan 100 ml. Heksana diuapkan dengan rotavapor sampai tidak menetes lagi dari pendingin, isolat dialiri gas nitrogen untuk mengusir oksigen dan sisa heksana bila masih ada, kemudian isolat ditimbang. Isolasi skualena dilakukan sebanyak tiga kali.

#### 4.3.1.2 Identifikasi skualena hasil isolasi

Untuk identifikasi isolat dibandingkan dengan karakteristik baku. Identifikasi meliputi penentuan harga  $R_f$  pada KLT, harga  $t_R$  pada GC, spektra IR, RMI dan MS dengan prosedur kerja sebagai berikut :

##### a. Kromatografi lapis tipis ( KLT ) :

Ditolkan skualena baku dan isolat masing-masing (5  $\mu$ l ) pada plat silika gel-254 F yang sama dengan jarak 2,0 cm dari batas bawah dan jarak antara 2 skualena tersebut 1,5 cm, dimana plat sebelum digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven



selama tiga jam pada suhu 100-120°C , kemudian dimasukkan dalam bejana pengembang yang berisi n-heksana sampai garis batas 7,0 cm. Plat diambil dan dibiarkan pada suhu kamar untuk menghilangkan sisa eluen, kemudian dideteksi dengan sinar ultraviolet dan noda yang terlihat ditandai serta diukur harga  $R_f$  nya.

b. Fourier transform Infra red ( FTIR ) :

Pertama- tama ditimbang serbuk KBr 50 mg , kemudian dibuat pelet KBr dengan alat pengempa , setelah pelet jadi,isolat diteteskan 10 $\mu$ l pada pelet tersebut dan diamati , hal tersebut juga dilakukan untuk skualena baku.

c. Resonansi magnetik Inti ( RMI ):

Isolat  $\pm$  0,250 ml dilarutkan dalam tabung gelas dengan 0,500 ml  $CDCl_3$ , kemudian dimasukkan alat dan diamati . Hal tersebut dilakukan juga untuk skualena baku.

d. Kromatografi gas(GC) digunakan kondisi alat sebagai berikut :

1. Kolom yang digunakan : OV-1
2. Suhu injektor : 280°C
3. Suhu detektor : 280°C
4. Suhu oven : 240°C
5. Laju & gas pembawa : laju udara = 2,1 kgf/cm<sup>2</sup>; H<sub>2</sub> =2,7 kgf/cm<sup>2</sup>  
dan N<sub>2</sub> =2,6 kgf/cm<sup>2</sup>
6. Volume injeksi : 0,2  $\mu$ L

Skualena baku dan isolat langsung diinjeksikan ke injektor sebanyak 0,2 $\mu$ L

#### 4.4 Uji aktivitas penangkap radikal skualena isolat ; skualena baku dan $\alpha$ -tokoferol terhadap DPPH ( Joyeux Michel ; 1995 )

##### 4.4.1 Preparasi larutan skualena baku

Ditimbang teliti  $\pm$  1g skualena baku , masukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 10,0 ml dan tambahkan etanol sampai tanda garis , sehingga diperoleh larutan dengan kadar 100.000 ppm . Dari larutan induk dibuat 6 macam kadar larutan yaitu 20.000 ppm ; 40.000 ppm ; 50.000 ppm ; 60.000 ppm ; 70.000 ppm dan 80.000 ppm.

##### 4.4.2 Preparasi larutan skualena isolat.

Ditimbang teliti  $\pm$  5 g isolat , masukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 10,0 ml dan tambahkan etanol sampai tanda garis , sehingga diperoleh larutan dengan kadar 500.000 ppm . Dari larutan induk dibuat 6 macam kadar larutan yaitu 50.000 ppm; 100.000 ppm ; 200.000 ppm ; 250.000 ppm ; 300.000 ppm dan 400.000 ppm.

##### 4.4.3 Preparasi larutan $\alpha$ - tokoferol

Ditimbang teliti  $\pm$  1mg  $\alpha$ -tokoferol , masukkan secara kuantitatif kedalam labu ukur 10,0 ml dan tambahkan etanol sampai tanda garis , sehingga diperoleh larutan dengan kadar 100 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat 6 macam kadar 5 ppm ; 10 ppm ; 15 ppm ; 20 ppm ; 25 ppm dan 30 ppm.

#### 4.4.4 Preparasi larutan difenil pikril hidrazil (DPPH)

Ditimbang 4,000 mg DPPH , masukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan etanol sampai tanda garis, sehingga diperoleh larutan dengan kadar 0,004 %.

#### 4.4.5 Cara kerja uji aktivitas penangkap radikal

Diambil 1,0 ml larutan skualena baku dari berbagai kadar , masing - masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda ; kemudian dimasukkan 2 ml larutan DPPH pada tiap tabung. Campuran tersebut diamati 0,0 jam ; 1,0 jam; 2,0 jam; 3,0 jam ; 4,0 jam dan 5,0 jam dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$ , sebagai larutan blanko digunakan etanol 1ml sebagai ganti sampel. Selanjutnya dengan cara yang sama, dilakukan untuk larutan skualena isolat dan larutan  $\alpha$ - tokoferol. Pemeriksaan dilakukan dengan lima replikasi.

Perhitungan hasil adalah sebagai berikut :

$$\% \text{ penurunan intensitas warna} = [ 1 - ( A_s/A_b ) ] 100 \%$$

dimana :

$A_s$  = absorpsi sampel dan  $A_b$  = absorpsi blanko

Selanjutnya untuk mempermudah mengambil kesimpulan dilakukan perhitungan luas area dibawah kurva dari % P/ppm mulai 0 jam sampai 5 jam

Berdasarkan rumus  $[ AUC ]^n = \frac{P_n + P_{n-1}}{2} ( t_n - t_{n-1} )$

(Shargel Leon, et al., 1980 )

dimana : P = peredaman dan  $t_n$  = waktu ke n jam

#### **4.5 Uji aktivitas antiperoksida lemak skualena baku; skualena isolat dan $\alpha$ - tokoferol pada homogenat hepar tikus dengan induksi *t*-BHP**

##### **4.5.1 Preparasi homogenat hepar tikus putih Strain Wistar jantan (Yoshino Kyoyi et. al , 1994 )**

Tikus dianestesi dengan eter , kemudian dibaringkan ditempat operasi dan keempat kakinya diikat . 0,5 ml heparin disuntikkan secara intravena. Rongga peritoneal dan rongga toraks dibuka ; vena cava inferior dan vena cava superior diputus. Darah yang ada di hepar dibilas NaCl fisiologis melalui vena porta dengan menggunakan kanula , sampai hepar terlihat memucat dari coklat merah menjadi coklat muda ; kemudian hepar diambil dan ditimbang beratnya . Hepar dihomogenasi dengan 19 bagian larutan buffer fosfat pH = 7,4 dan disentrifus dengan kecepatan 9000 G .

##### **4.5.2 Preparasi larutan skualena baku dan skualena isolat**

Ditimbang 10,00 mg skualena baku dimasukkan secara kuantitatif kedalam 100 ml labu ukur dilarutkan dengan sedikit etanol, kemudian ditambah aquabides sampai tanda garis, sehingga diperoleh kadar larutan 100 ppm. Dari larutan induk tersebut diatas dibuat kadar skualena 10; 25 ppm ; 50 ppm dan 75 ppm, demikian juga untuk skualena isolat dibuat dengan cara yang sama.

#### 4.5.3 Preparasi larutan $\alpha$ -tokoferol

Ditimbang 10,00 mg  $\alpha$ -tokoferol dimasukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 100,0 ml dilarutkan dengan sedikit etanol kemudian tambahkan aquabides sampai tanda garis, sehingga diperoleh kadar larutan 100 ppm. Dari larutan induk tersebut dibuat larutan dengan kadar 10 ; 25 ppm ; 50 ppm dan 75 ppm.

#### 4.5.4 Preparasi larutan *tert*-Butil Hidroperoksida (*t*-BHP)

Ditimbang 100 mg *t*-BHP dimasukkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 10 ml dan tambahkan aquabides sampai tanda garis , sehingga diperoleh kadar larutan *t*-BHP 1 %

#### 4.5.5 Uji aktivitas antiperoksida lemak dengan metode Yoshino Kyoyi, *et al.*, (1994)

Disiapkan dua puluh tabung reaksi bertutup dengan volume 10 ml, kemudian dibagi menjadi empat kelompok masing - masing 5 tabung yaitu :

Kelompok satu sebagai blanko I diisi dengan 0,5 ml homogenat , 2,250 ml aquabides dan 0,5 ml larutan skualena 10 ppm, kemudian diaduk dengan vortex. Kelompok dua sebagai blanko II diisi dengan 0,5 ml homogenat dan 2,750 ml aquabides , diaduk dengan vortex. Kelompok tiga sebagai kontrol berisi 0,5 ml homogenat, 2,725 ml

aquabides dan 25  $\mu\text{L}$  t-BHP, kemudian diaduk dengan vortex dan kelompok empat sebagai larutan uji diisi dengan 0,5 ml homogenat, 2,225 ml aquabides ; 0,5 ml larutan squalena 5 ppm dan 25  $\mu\text{L}$  t-BHP kemudian diaduk dengan vortex. Kedua puluh tabung reaksi tersebut diatas semuanya diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Setelah diinkubasi kemudian dilanjutkan dengan langkah - langkah sebagai berikut :

Disiapkan dua puluh tabung reaksi baru dan masing - masing tabung diisi dengan 1,3 ml larutan yang telah diinkubasi sesuai kelompok masing - masing , kemudian ditambahkan berturut-turut 0,1ml larutan SDS 10 % , 0,8 ml HCl dan 1 ml TBA1%. Kedua puluh tabung reaksi tersebut diatas kemudian diinkubasi dalam penangas air 95°C selama 45 menit. Sesudah itu semua tabung didinginkan dan setelah dingin ditambahkan 4 ml n-butanol, diaduk dengan vortex. Didiamkan sebentar dan ambil fase n-butanol , diamati intensitas fluorometrisnya (E) dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  emisi = 549 nm dan  $\lambda$  eksitasi = 539 nm.

Potensial antiperoksida lemak squalena dan  $\alpha$ -tokoferol dapat dihitung dengan persamaan sebagai berikut :

$$\text{Aktivitas antiperoksidasi lemak (\%)} = \left[ 1 - \frac{(\text{E.Sed. Uji} - \text{E.Blanko I})}{(\text{E.Kontrol} - \text{E.Blanko II})} \right] \times 100 \%$$

Pemeriksaan diatas diulang dengan cara yang sama , tetapi kadar larutan skualena diganti 25 ppm ; 50 ppm ; 75 ppm dan 100 ppm. Dengan cara yang sama dilakukan untuk skualena isolat dan  $\alpha$ -tokoferol. Masing - masing kadar dilakukan lima kali replikasi.

#### 4.6 Analisa data

- a. Untuk menguji apakah ada perbedaan aktivitas penangkap radikal bebas larutan DPPH oleh skualena standar dan skualena isolat dibanding dengan  $\alpha$ -tokoferol dilakukan uji Anava one way , pada  $\alpha = 5\%$  . Perhitungan Anava dilakukan dengan program SPSS. Jika diperoleh harga  $p < 0,05$  berarti ada perbedaan bermakna antar perlakuan, maka selanjutnya dilakukan uji beda antar perlakuan dengan uji LSD.
- b. Untuk menguji apakah ada perbedaan aktifitas antiperoksida lemak skualena standar dan skualena isolat pada homogenat hepar dengan induksi f-BHP dibanding dengan  $\alpha$ -tokoferol, maka dilakukan uji Anava one way pada  $\alpha = 5\%$  . Perhitungan Anava dilakukan dengan program SPSS. Jika diperoleh harga  $p < 0,05$  berarti ada perbedaan bermakna antar perlakuan, maka selanjutnya dilakukan uji beda antar perlakuan dengan uji LSD.





**BAB 5****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS PENELITIAN****5.1 Isolasi dan pemurnian skualena**

Hasil isolasi skualena dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol adalah sebagai berikut ( Tabel 5.1 )

Tabel 5.1 Isolasi Skualena dari Minyak Hati Ikan Hiu Cucut Botol

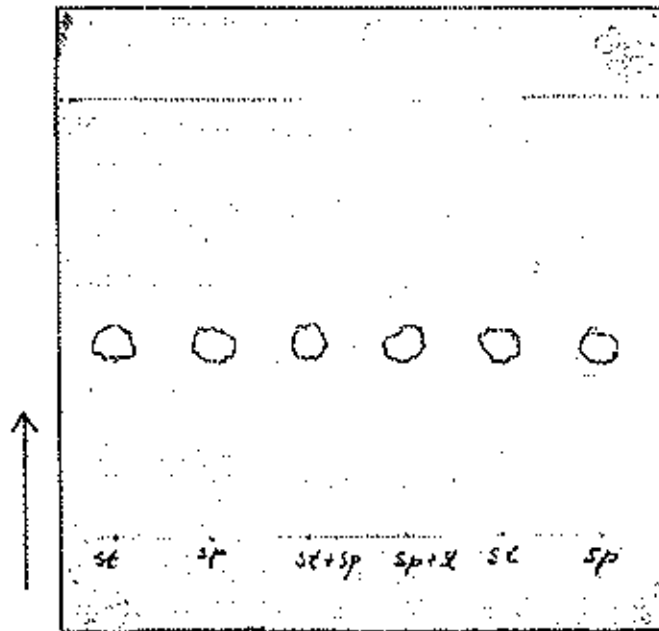
Percobaan	Berat minyak hati ikan Hiu ( g )	Berat Isolat ( g )	% Hasil isolasi
1	5,100	3,835	75,196
2	5,150	3,973	77,146
3	5,050	3,795	75,149
Rata-rata	5,100	3,867	75,830
SD	0,050	0,093	1,140

Jadi % hasil isolasi skualena yang diperoleh dari tiga kali isolasi adalah :  $75,830 \pm 1,140$  %

## 5.2 Identifikasi skualena isolat

### 5.2.1 Hasil identifikasi dengan Kromatografi lapisan tipis ( KLT )

Kromatogram dan harga Rf dari skualena isolat dan skualena baku adalah sebagai berikut (Gambar 5.1) :

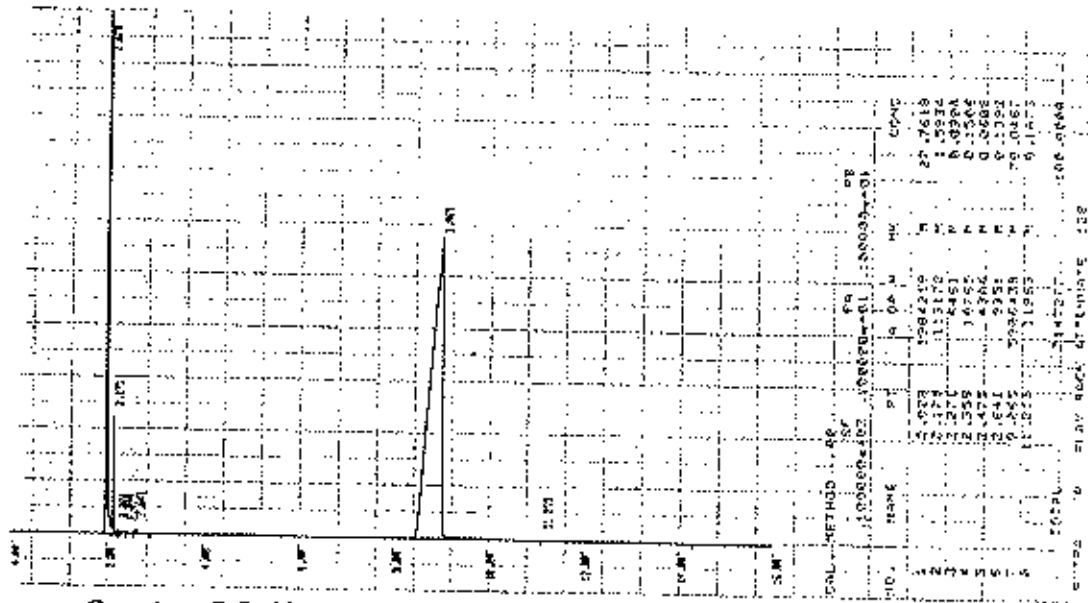


Gambar 5.1 Kromatografi lapisan tipis skualena isolat dan skualena baku dengan fase gerak heksana, St = skualena baku, Sp = isolat ( sampel )

Dari masing - masing dua kali penotolan diperoleh : Rf skualena isolat =  $3,20 / 7,00 = 0,457$  , sedang Rf skualena baku =  $3,20 / 7,00 = 0,457$ . Dilakukan adisi skualena isolat dengan skualena baku diperoleh harga Rf  $3,20 / 7,00 = 0,457$  ; sehingga dapat disimpulkan bahwa larutan isolat identik dengan skualena baku.

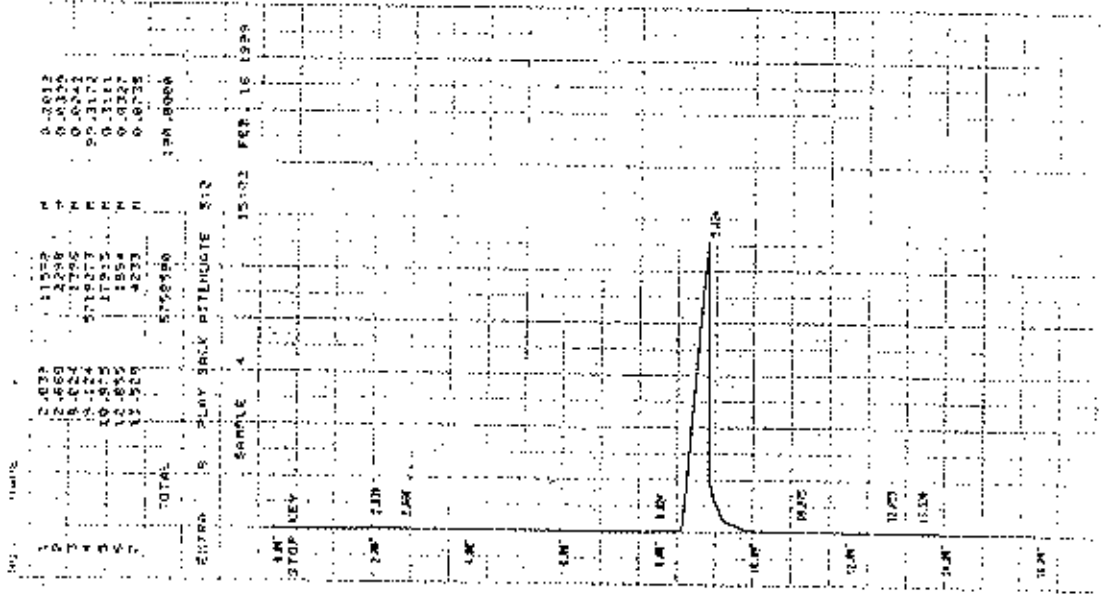
5.2.2 Hasil identifikasi dengan Gas Kromatografi ( GC )

Kromatogram dan harga  $t_R$  dari skualena Isolat ( Gambar 5.2 ) adalah



Gambar 5.2 Kromatogram Skualena Isolat

Adapun kromatogram dari skualena baku ( Gambar 5.3 ) adalah sebagai

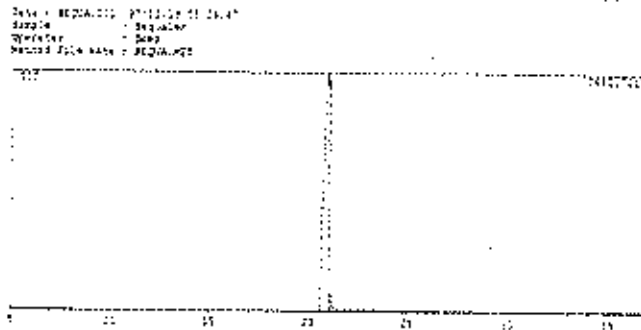


Gambar 5.3 Kromatogram Skualena baku

Skualena Isolat mempunyai waktu retensi = 9,065 menit , skualena baku mempunyai waktu retensi = 9,124 menit, keduanya mempunyai waktu retensi yang sama sehingga dapat disimpulkan sementara bahwa isolat identik dengan baku.

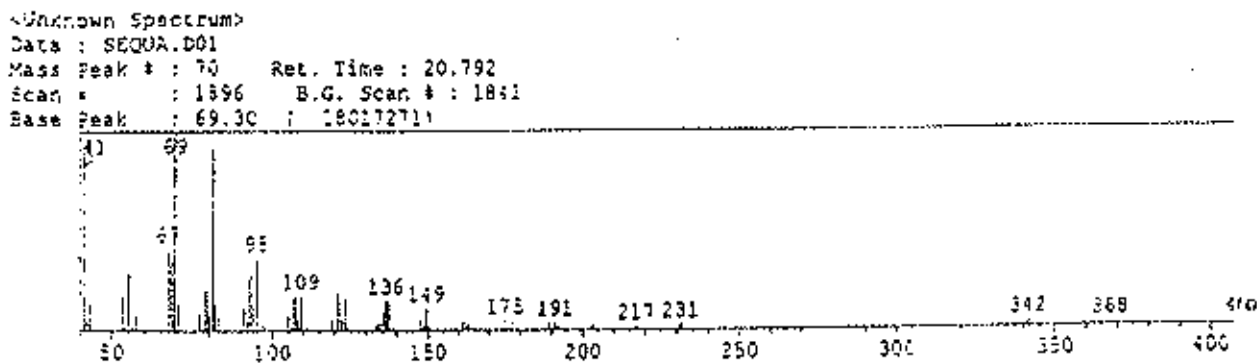
### 5.2.3. Hasil identifikasi dengan GC-MS

Kromatogram dari skualena isolat ( Gambar 5.4 ) dan spektrum massa skualena isolat ( Gambar 5.5 ) adalah sebagai berikut :



Gambar 5.4 Kromatogram Skualena Isolat

Hasil identifikasi dengan Spektromassa dari skualena isolat adalah sebagai berikut ( Gambar 5.5 ) :



Gambar 5.5 Spektrum massa Skualena Isolat



Dari Gambar 5.5 dan Gambar 5.6, dibuat Tabel 5.2 yang menunjukkan hasil fragmentasinya dari skualena isolat dan skualena baku adalah sebagai berikut :

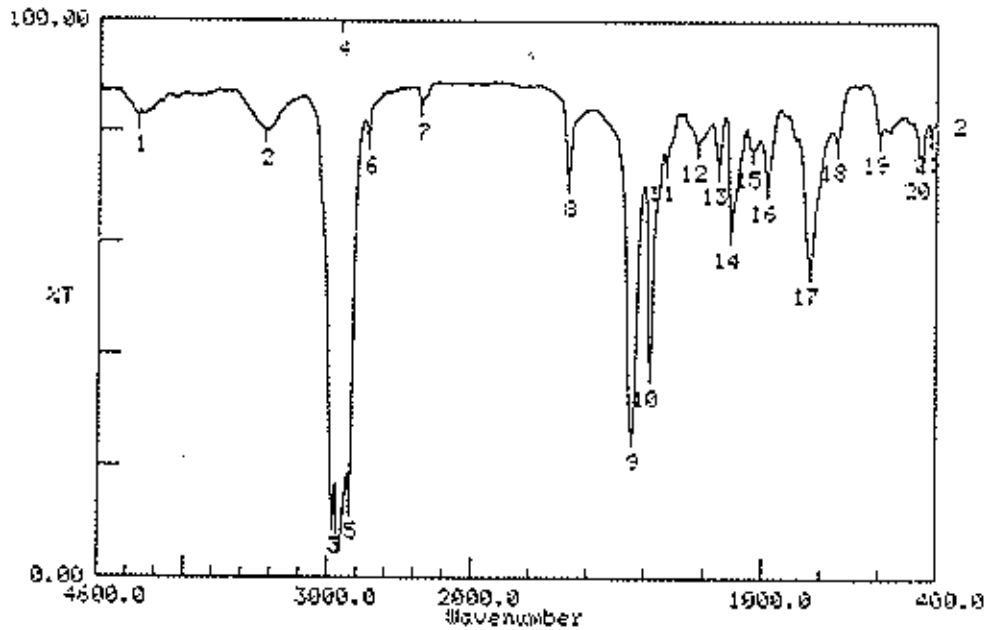
Tabel 5.2 Hasil fragmentasi dari Skualena Isolat

Skualena "Library"	Skualena Isolat	Keterangan
41	41	$C_3H_5$
55	55	$C_4H_7$
69	69	$C_5H_9$
81	81	$C_6H_9$
95	95	$C_7H_{11}$
109	109	$C_8H_{13}$
123	123	$C_{10}H_{13}$
137	*136	$C_{11}H_{15}$ & * $C_{11}H_{14}$
149	149	$C_{12}H_{15}$
161	161	$C_{13}H_{15}$
177	*175	$C_{14}H_{19}$ & * $C_{14}H_{17}$
191	191	$C_{15}H_{23}$
203	203	$C_{16}H_{23}$
231	231	$C_{18}H_{27}$
410	411	$C_{30}H_{50}$

Fragmentasi yang tertinggi adalah  $m/e = 69$  yaitu satu unit isoprena ( $C_5H_9$ ) dimana molekul skualena terdiri dari 6 unit isoprena ( Gambar 5.12 ). Fragmentasi yang diperoleh dari skualena isolat dan skualena baku mempunyai fragmen dengan massa yang sama . Sehingga dapat disimpulkan isolat identik dengan skualena baku.

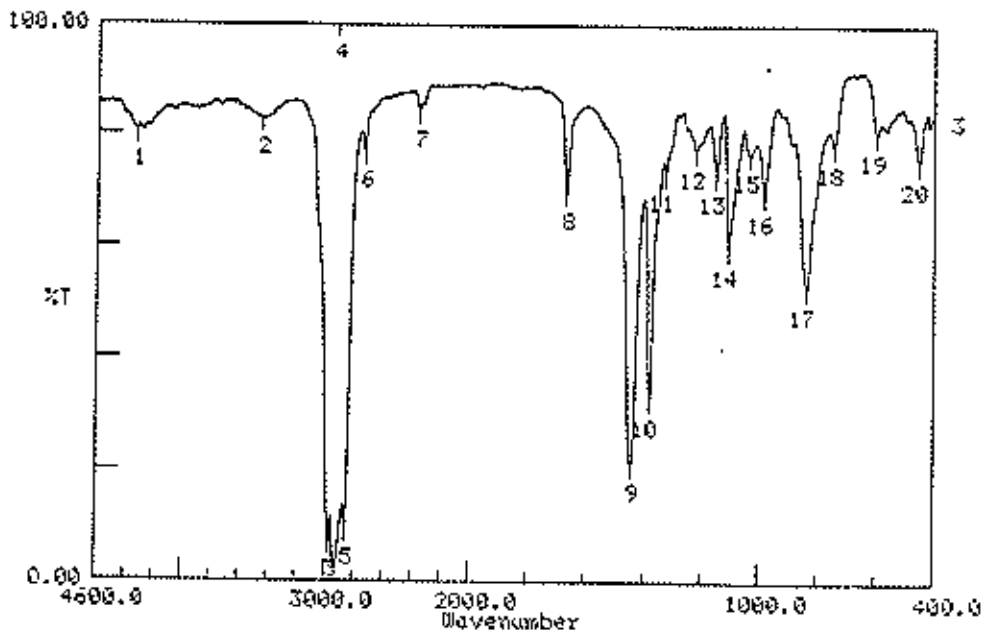
### 5.2.4 Hasil identifikasi dengan Spektrofometer Infra Merah ( FTIR )

Spektrum infra merah skualena isolat ditunjukkan oleh Gambar 5.7 dengan nilai bilangan gelombangnya terlihat sebagai berikut :



Gambar 5.7. Spektrum Infra Merah Skualena Isolat

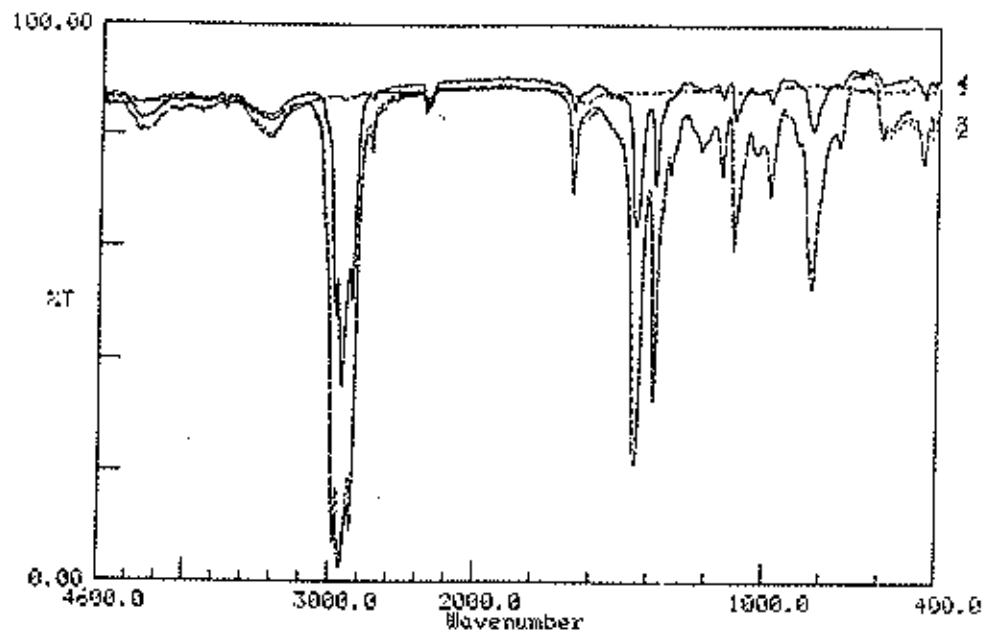
Hasil identifikasi dengan spektro infra merah dari skualena baku adalah sebagai berikut ( Gambar 5.8 ) :



Gambar 5.8 Spektrum Infra Merah Skualena baku



Hasil identifikasi dengan spektro infra merah dari adisi skualena baku dan skualena isolat adalah sebagai berikut ( Gambar 5.9 ) :



Gambar 5.9 Tumpukan spektra (1) KBr ( ..... ) ; (2) Skualena baku ( -- ---- ) ; (3) Skualena Isolat ( -.-.-.- ) ; ( 4 ) Skualena Isolat ( \_\_\_\_\_ )

Dari ketiga spektra skualena baik isolat maupun baku dapat dibuat tabel bilangan gelombang sebai berikut ( Tabel 5.3 ) :

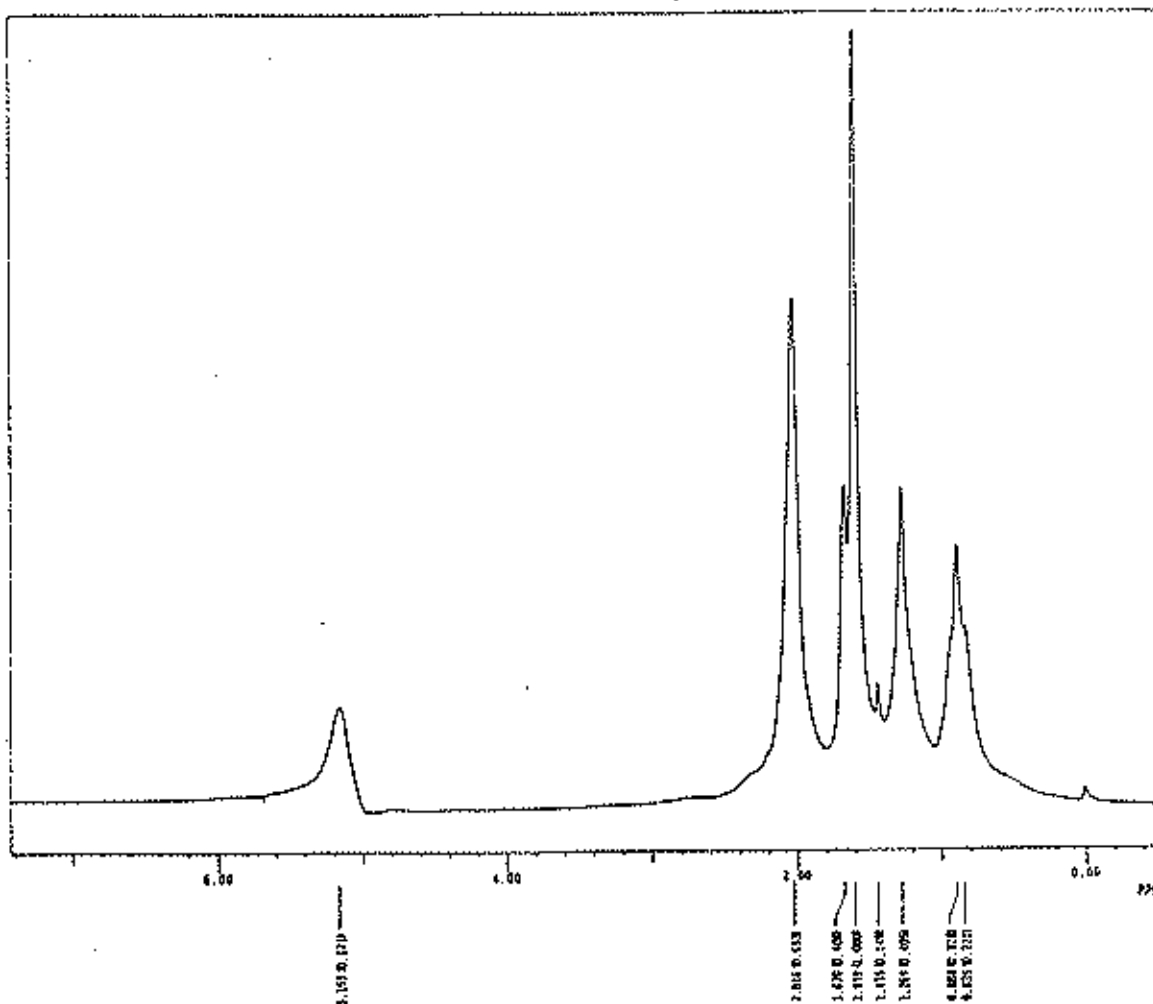
Tabel 5.3 Bilangan gelombang dari Skualena Isolat dan Skualena baku

Skualena baku	Skualena isolat	Keterangan
2980 - 2850	2980 - 2850	CH dari metil dan metilena
1668,58 & 1446,74	1668,58 & 1446,74	C = C
1381,18 & 835,25	1381,16 & 835,25	Bentuk cabang
835,25	835,25	Trisubsitutsi

Dari bilangan gelombang yang terbaca menunjukkan adanya ikatan rangkap, bentuk percabangan dan trisubstitusi ; hal ini menunjukkan satu unit isoprenil (Gambar 5.12 ), sehingga dapat diduga isolat sama dengan skualena baku.

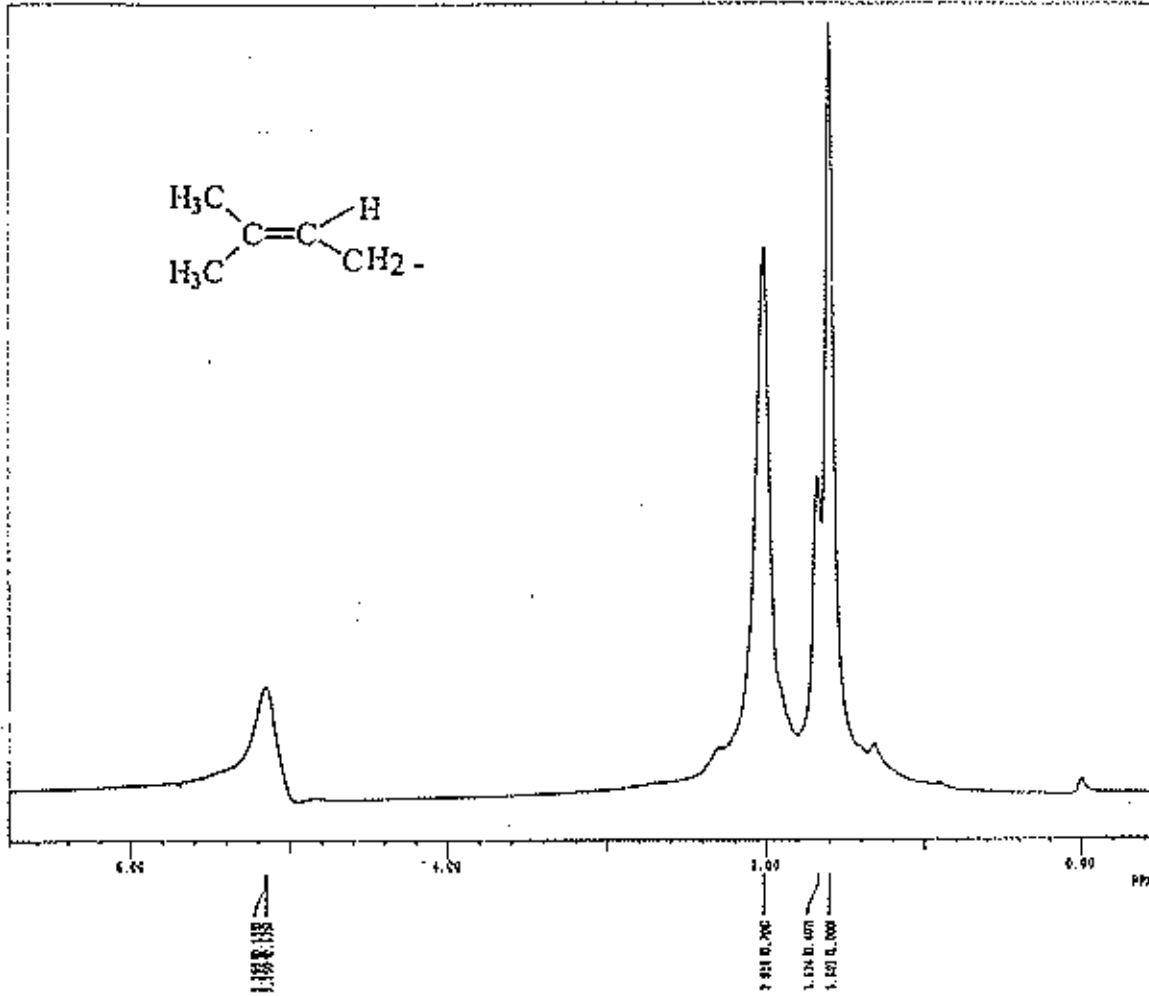
### 5.2.5 Hasil identifikasi dengan Resonansi Magnetik Inti

Spektrum RMI proton ( $^1\text{H}$ ) dari skualena isolat (Gambar 5.10) adalah sebagai berikut :



Gambar 5.10 Spektrum RMI  $^1\text{H}$  Skualena Isolat

Spektrum RMI proton ( $^1\text{H}$ ) dari skualena isolat (Gambar 5.11 ) adalah sebagai berikut :

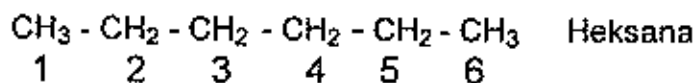
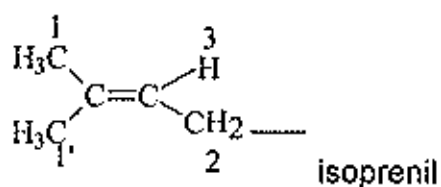


Gambar 5.11 Spektrum RMI  $^1\text{H}$  Skualena baku

Berdasarkan spektra RMI  $^1\text{H}$  dari skualena isolat dan skualena baku dapat dibuat daftar nilai geseran kimianya ( Tabel 5.4 ) sebagai berikut

Tabel 5.4 Interpretasi Pergeseran Kimia ( $\delta$ ) Pada RMI Proton

Skualena baku	Skualena isolat	Keterangan
-	0,835 & 0,888	H <sub>1</sub> dari heksana
-	1,269 & 1,435	H <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> , H <sub>4</sub> dari heksana
1,601 & 1674	1,599 & 1,670	H <sub>2</sub>
2,016	2,016	H <sub>1</sub>
5,150 & 5,155	5,155	H <sub>3</sub>



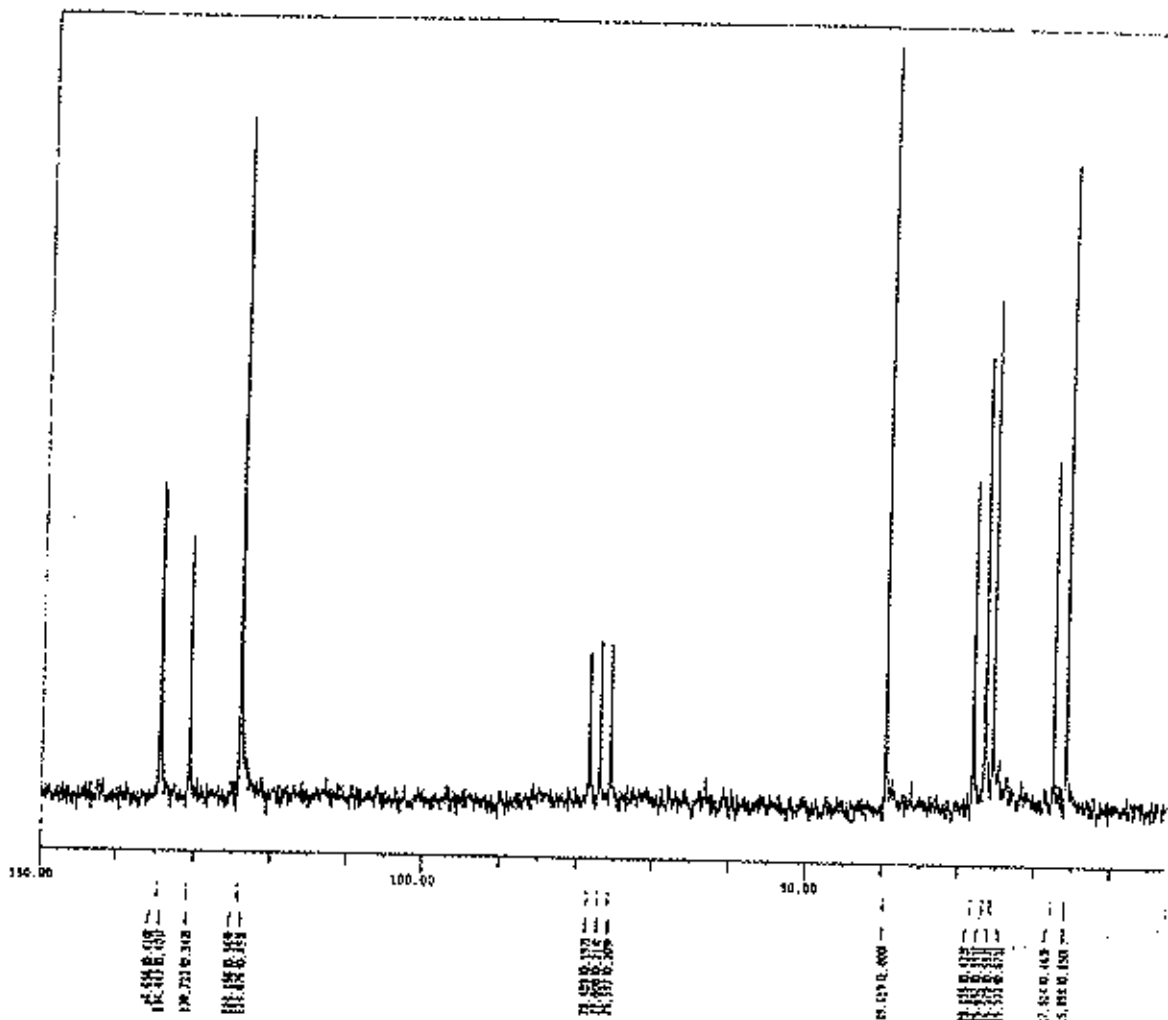
Gambar 5.12 Satu unit isoprenil dan heksana

Dari hasil spektra proton dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan skualena baku.



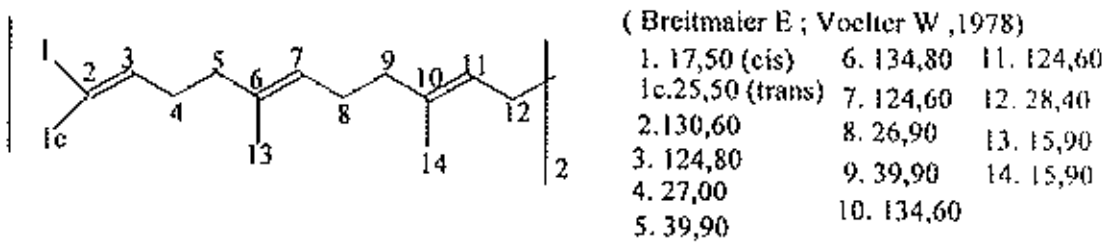
Hasil identifikasi atom karbon ( $^{13}\text{C}$ ) skualena baku dengan RMI

( Gambar 5.14 ) adalah sebagai berikut :



Gambar 5.14 Spektrum RMI  $^{13}\text{C}$  Skualena baku

Breitmaier E et. all ( 1978 ) dalam buku memberikan gambaran separo dari molekul skualena ( Gambar 5.15 ) adalah sebagai berikut :



Gambar 5.15 Gambaran separo struktur molekul Skualena ( C<sub>15</sub>)

Berdasarkan gambar 5.15 maka spektra RMI <sup>13</sup> C skualena baku ( Gambar 5.14 ) dan skualena isolat ( Gambar 5.13 ) dapat diinterpretasikan sebagai berikut ( Tabel 5.5 )

Tabel 5.5 Interpretasi Pergeseran Kimia Skualena (  $\delta$  ) <sup>13</sup> C

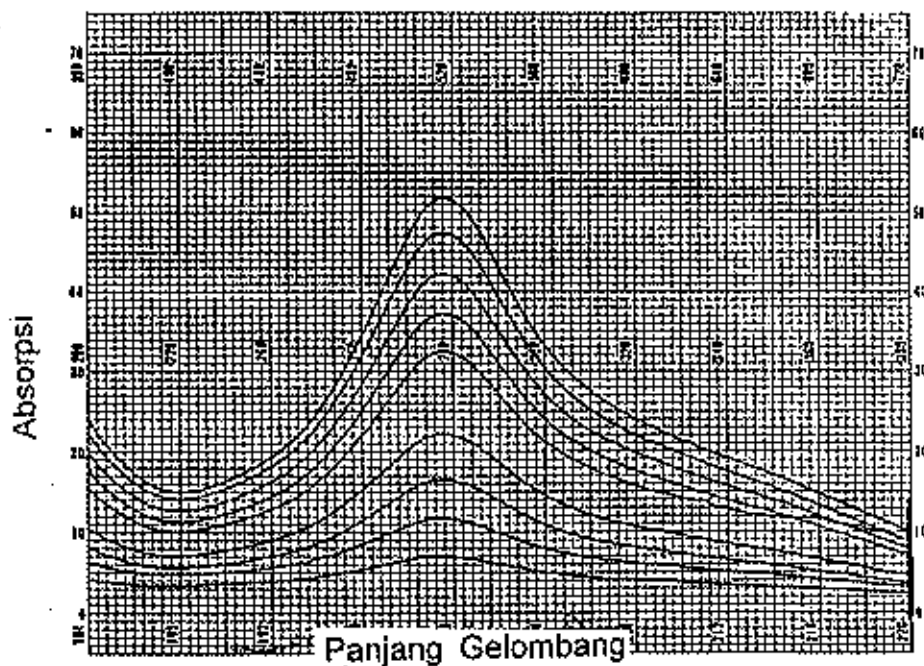
$\delta$ ( ppm ) baku	$\delta$ ( ppm ) isolat	Keterangan
-	11,29 ; 14,008	C - 1 dari Heksana
15,6	15,6	C -13 dan 14
17,514	17,514	C-1 (cis )
-	22,515 ; 22,667	C - 2 heksana
25,533	25,289 ; 25,503 ;	C -1c ( trans )
26,570 ; 26,692	26,661 ; 26,814	C-4 ; C-8
28,155	28,277	dan C- 12
-	29,070	C - 4 dari heksana
-	31,630	C - 3 dari heksana
39,619	39,741	C-5 dan C-9
124,076 ; 124,198	124,168 ; 124,320	C-3 ; C-7 dan C-11
130,723	130,601	C-2
134,443 ; 134,656	134,412 ; 134,595	C-6 dan C-10

Dari nilai pergeseran kimia dari karbon antara isolat dan skualena baku terdapat beberapa yang sama , sehingga dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan skualena baku.

Dari keseluruhan data hasil identifikasi yaitu KLT; MS; IR; GC dan RMI dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan baku

### 5.3 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum serta Linieritas dari larutan Difenil Pikril Hidrazil

Untuk memperoleh absorpsi yang maksimum dari larutan DPPH yang berwarna pink maka dibuat kurva antara absorpsi dan panjang gelombang didaerah sinar tampak (  $\lambda = 300-720 \text{ nm}$  ) adalah sebagai berikut ( Gambar 5.16 ) :



Gambar 5.16 Spektra antara Panjang Gelombang dan Absorpsi dari larutan DPPH dalam Etanol



Dari pembacaan spektra antara absorpsi dan kadar larutan DPPH dalam etanol diperoleh panjang gelombang maksimum adalah 517 nm (Gambar 5.16). Selanjutnya dilakukan pembacaan absorpsi dari berbagai kadar larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum tersebut dan hasilnya adalah sebagai berikut ( Tabel 5.6 ) :

Tabel 5.6 Hasil Absorpsi dari Berbagai Kadar larutan DPPH dalam etanol

No.	Kadar DPPH (%)	Absorpsi
1	100	0,888
2	90	0,825
3	80	0,808
4	70	0,698
5	60	0,642
6	40	0,345
7	30	0,244
8	20	0,200
9	10	0,148



## 5.4 Hasil Uji Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH dari Skualena Isolat ;

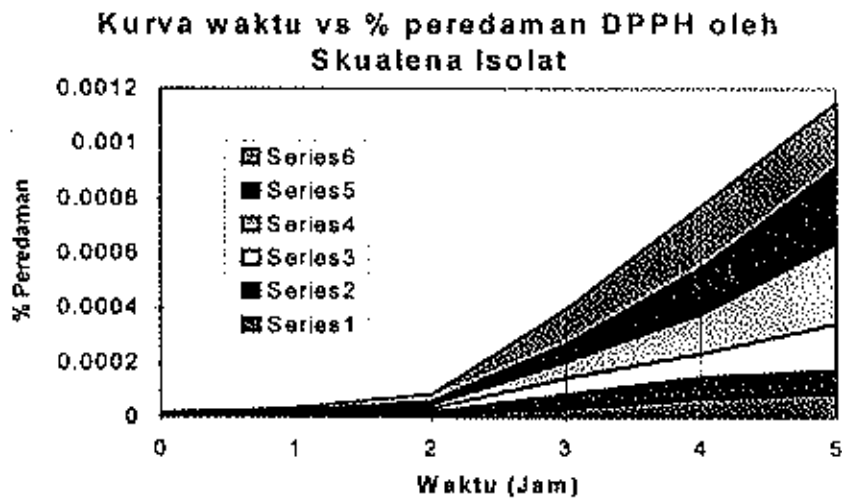
### Skualena Baku dan $\alpha$ - Tokoferol

#### 5.4.1 Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH dari Skualena Isolat

Dari enam kali percobaan aktivitas antiradikal DPPH dari skualena isolat yang dilakukan selama 5 jam ( Tabel 5.7 ) dan kurva antara waktu dan % aktivitas peredaman DPPH(Gambar 5.18) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.7 % Aktivitas Antiradikal bebas DPPH Spesifik Skualena Isolat dalam pelarut Etanol diamati pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$

No.	% Aktifitas antiradikal / ppm Skualena Isolat					
	0,0 jam	1,0 jam	2,0 jam	3,0 jam	4,0 jam	5,0 jam
1	0,219. $10^{-5}$	0,219. $10^{-5}$	0,924. $10^{-5}$	3,229. $10^{-5}$	6,898. $10^{-5}$	8,683. $10^{-5}$
2	0,218. $10^{-5}$	0,282. $10^{-5}$	1,073. $10^{-5}$	5,364. $10^{-5}$	7,800. $10^{-5}$	8,923. $10^{-5}$
3	0,163. $10^{-5}$	0,372. $10^{-5}$	1,213. $10^{-5}$	5,780. $10^{-5}$	8,673. $10^{-5}$	16,644. $10^{-5}$
4	0,201. $10^{-5}$	0,714. $10^{-5}$	1,324. $10^{-5}$	6,136. $10^{-5}$	14,197. $10^{-5}$	29,317. $10^{-5}$
5	0,247. $10^{-5}$	0,799. $10^{-5}$	1,514. $10^{-5}$	6,150. $10^{-5}$	17,080. $10^{-5}$	27,909. $10^{-5}$
6	0,599. $10^{-5}$	1,286. $10^{-5}$	2,557. $10^{-5}$	12,860. $10^{-5}$	22,711. $10^{-5}$	23,764. $10^{-5}$



Gambar 5.18 Kurva antara Waktu dan % peredaman DPPH oleh Skualena Isolat .

Dari Tabel 5.7 dibuat kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena isolat ( Gambar 5.18) ; kemudian dilakukan penghitungan luas area dibawah kurva dari 0 jam sampai 5 jam dan hasilnya adalah sebagai berikut ( Tabel 5.8 ) :

Tabel 5.8 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualena isolat dari 6 kali replikasi (I s/d VI) antara 0,0 - 5,0 jam

Replikasi	I	II	III	IV	V	VI
% aktivitas Antiradikal DPPH	0,00016	0,00019	0,00024	0,00037	0,00040	0,00052

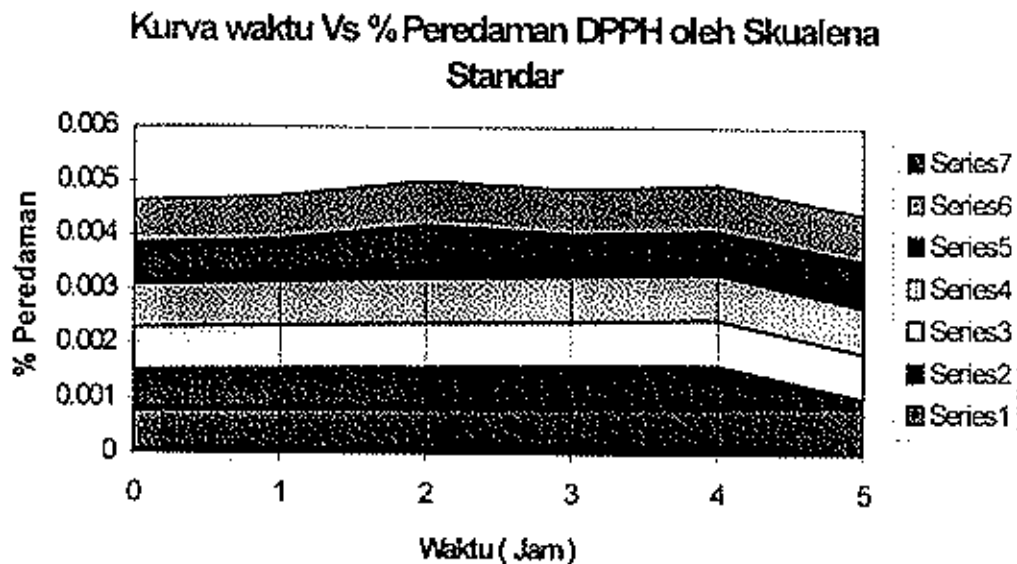
#### 5.4.2 Aktivitas antiradikal bebas DPPH dari Skualena baku

Perlakuan yang sama dari skualena baku dengan skualena isolat diperoleh hasil % aktivitas peredaman DPPH ( Tabel 5.9 ) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.9 % Aktivitas Antiradikal bebas DPPH Spesifik Skualena baku dalam pelarut Etanol diamati pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$

No.	% Aktifitas antiradikal / ppm Skualena baku					
	0,0 jam	1,0 jam	2,0 jam	3,0 jam	4,0 jam	5,0 jam
1	7,608. $10^{-4}$	7,820. $10^{-4}$	8,036. $10^{-4}$	8,182. $10^{-4}$	8,298. $10^{-4}$	8,589. $10^{-4}$
2	7,517. $10^{-4}$	7,629. $10^{-4}$	7,819. $10^{-4}$	7,941. $10^{-4}$	8,063. $10^{-4}$	8,173. $10^{-4}$
3	7,783. $10^{-4}$	7,933. $10^{-4}$	8,026. $10^{-4}$	8,083. $10^{-4}$	8,207. $10^{-4}$	8,251. $10^{-4}$
4	7,819. $10^{-4}$	8,013. $10^{-4}$	8,089. $10^{-4}$	8,198. $10^{-4}$	8,340. $10^{-4}$	8,420. $10^{-4}$
5	7,606. $10^{-4}$	7,761. $10^{-4}$	8,883. $10^{-4}$	7,923. $10^{-4}$	8,040. $10^{-4}$	8,507. $10^{-4}$
6	7,865. $10^{-4}$	8,101. $10^{-4}$	8,227. $10^{-4}$	8,337. $10^{-4}$	8,447. $10^{-4}$	8,516. $10^{-4}$

Berdasarkan Tabel 5.9 dibuat kurva antara waktu dan % peredaman skualeen baku terhadap DPPH ( Gambar 5.19 ) adalah sebagai berikut



Gambar 5.19 Kurva antara Waktu dan % Peredaman DPPH oleh Skualena baku

Dari Gambar 5.19 dilakukan penghitungan luas area dibawah kurva antara 0 jam sampai 5 jam dan hasilnya sebagai berikut ( Tabel 5.10 ):

Tabel 5.10 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh skualeena baku 6 kali replikasi (I s/d VI) antara 0,0 - 5,0 jam

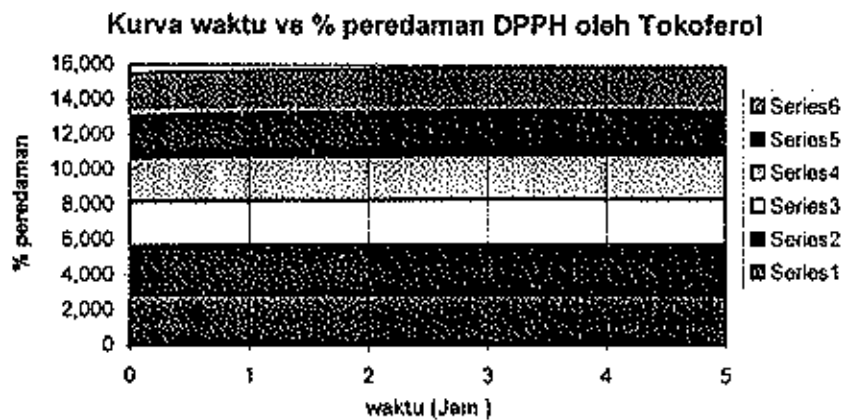
Replikasi	I	II	III	IV	V	VI
% aktivitas Antiradikal DPPH	0,00404	0,00393	0,00403	0,00408	0,00407	0,00413

### 5.4.3. Aktivitas antiradikal bebas DPPH dari $\alpha$ - Tokoferol

Dengan perlakuan yang sama seperti skualena diperoleh hasil % aktivitas peredaman DPPH oleh  $\alpha$  - Tokoferol ( Tabel 5.11) dan dibuat kurva antara waktu dan % peredaman (Gambar 5.20 ) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.11 % Aktivitas Antiradikal bebas DPPH Spesifik  $\alpha$  - Tokoferol dalam pelarut Etanol diamati pada  $\lambda = 517 \text{ nm}$

No.	% Aktifitas antiradikal / ppm $\alpha$ - Tokoferol					
	0,0 jam	1,0 jam	2,0 jam	3,0 jam	4,0 jam	5,0 jam
1	2,849	2,907	2,928	2,954	2,932	2,919
2	2,824	2,860	2,865	2,882	2,896	2,885
3	2,495	2,505	2,516	2,530	2,546	2,547
4	2,464	2,492	2,505	2,514	2,521	2,520
5	2,469	2,497	2,517	2,531	2,545	2,543
6	2,385	2,424	2,440	2,448	2,457	2,460



Gambar 5.20 Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh  $\alpha$  - Tokoferol

Dari kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh  $\alpha$ -tokoferol ( Gambar 5.20 ) diperoleh luas area dibawah kurva ( Tabel 5.12 ) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.12 Luas Area Dibawah Kurva antara waktu dan % peredaman DPPH oleh  $\alpha$  - tokoferol dari 6 kali replikasi antara 0,0 - 5,0 jam

Replikasi	I	II	III	IV	V	VI
% aktivitas Antiradikal DPPH	14,60500	14,35750	12,61800	12,52400	12,59600	12,19150

#### 5.4.4 Analisa data % Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH

Hasil dari tiga kelompok sampel yaitu skualena isolat ; skualena baku dan  $\alpha$  - Tokoferol (Tabel 5.13) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.13 Luas Area Dibawah Kurva dari Skualena Isolat ; Skualena baku dan  $\alpha$  - Tokoferol dengan kadar yang sama yaitu 1 ppm

No.	% Aktivitas Antiradikal DPPH		
	Skualena Isolat(1)	Skualena baku(2)	$\alpha$ - Tokoferol (3)
1	0,00016	0,00404	14,60500
2	0,00019	0,00393	14,35750
3	0,00024	0,00403	12,61800
4	0,00037	0,00408	12,52400
5	0,00040	0,00407	12,59600
6	0,00052	0,00413	12,19150
$\bar{X}$	0,00031	0,00405	13,14867
SD	0,00014	0,00006	1,04648



Berdasarkan data tersebut diatas ( Tabel 5.13) dilakukan uji Anava satu arah , hasilnya ( Tabel 5.14) adalah sebagai berikut :

Tabel 5. 14 Tabel Anava

Sumber variasi	D.F.	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F. Prop.
Perlakuan	2	691,3205	345,6602	946,9090	0.0000
Sisa	15	5,4756	0,3650		
Total	17	696.7961			

Perhitungan Anava dapat dilihat dalam lampiran :

Dari perhitungan diperoleh  $P = 0,000 < 0,05$  , jadi ada perbedaan bermakna antar perlakuan , maka selanjutnya dilakukan uji LSD.

Tabel 5.15 Tabel Perbedaan Rata - rata tiap perlakuan

	SK. Isolat	SK . baku	$\alpha$ - Tokoferol
SK Isolat	0	0,00374	13,14836*
SK Baku	0,00374	0	13,14462 *
$\alpha$ - Tokoferol	13,14836 *	13.14462 *	0
LSD = 0,42720			

#### Keterangan

\* = berbeda makna; SK = skualena

Dari hasil uji Anava satu arah dapat disimpulkan bahwa aktivitas isolat tidak berbeda makna dengan skualena baku , tetapi keduanya berbeda

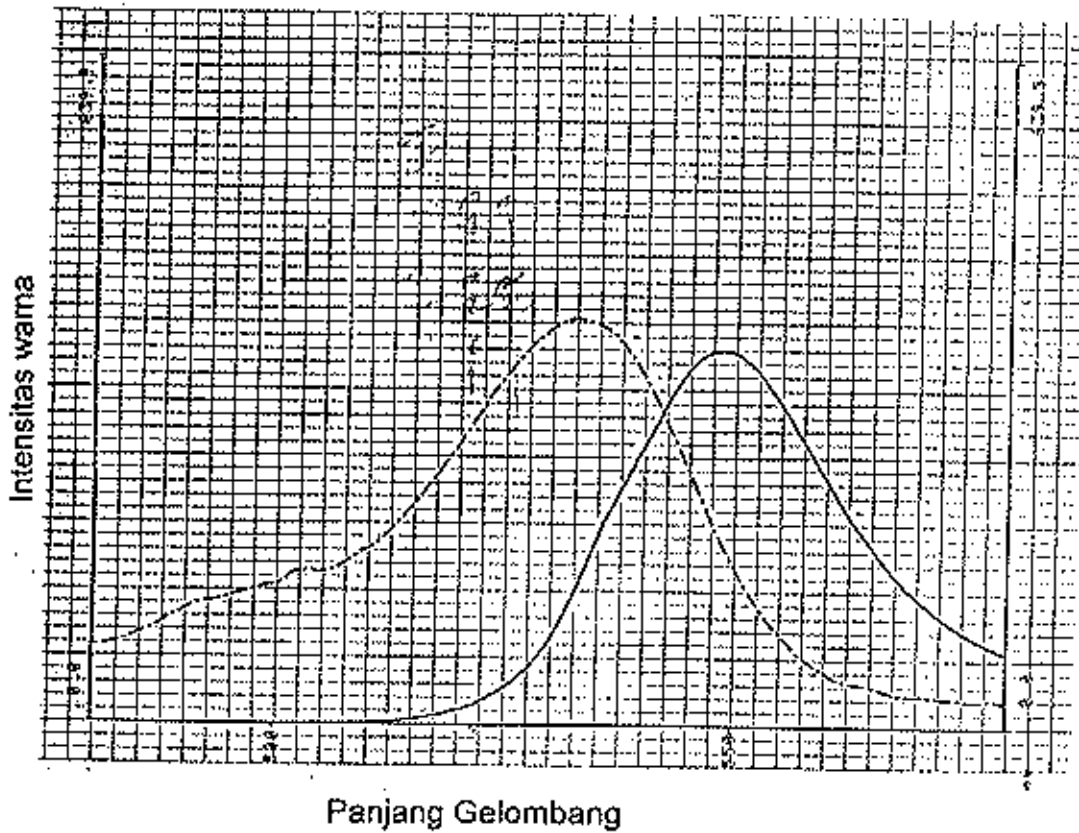
makna dengan  $\alpha$ - tokoferol. Jadi aktivitas antiradikal DPPH skualena isolat dan skualena baku lebih kecil dibanding  $\alpha$ - tokoferol.

## **5.5 Hasil Uji Aktivitas Antiperoksida Lemak dari skualena Isolat; Skualena Baku dan $\alpha$ - Tokoferol**

### **5.5.1 Linieritas Larutan MDA-TBA**

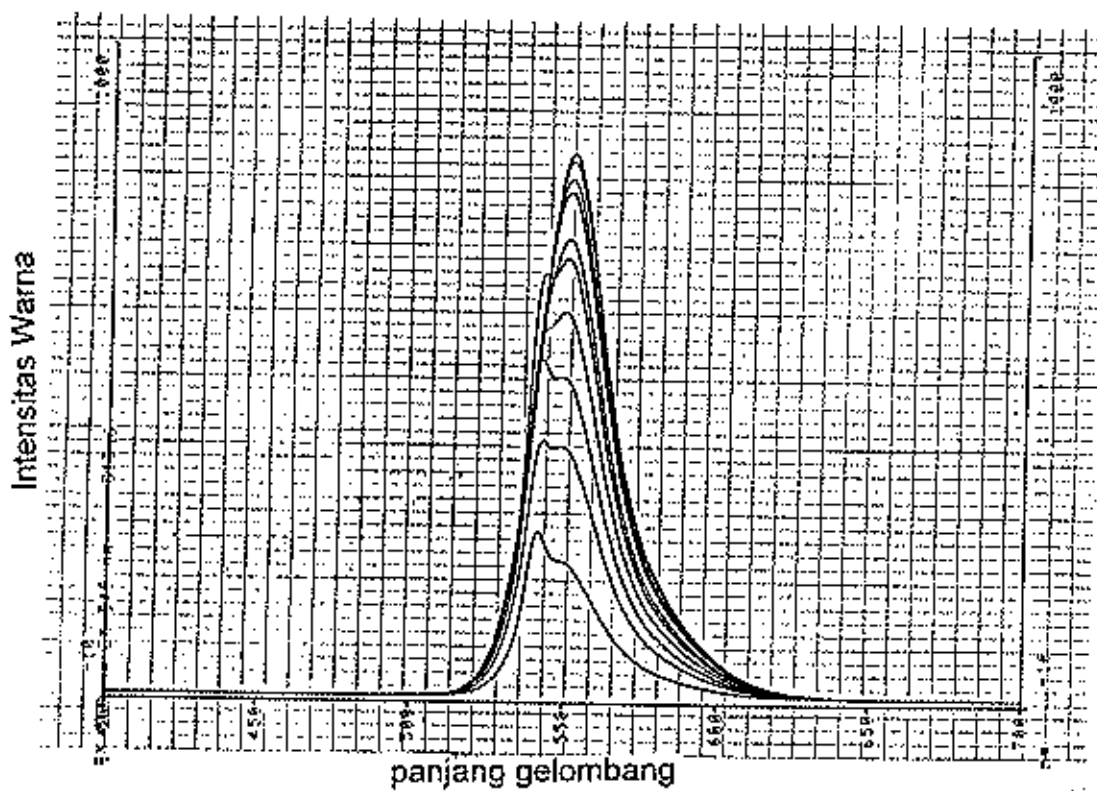
Larutan MDA-TBA merupakan larutan kontrol yang terdiri dari 0,5 ml homogenat ; 2,725 ml aquabides dan 25  $\mu$ L *ter*-BHP; kemudian larutan divortek dan dipanaskan 37° C selama 15 menit , cairan yang diperoleh berbentuk suspensi berwarna putih. Suspensi diambil 1,30 ml masuk tabung yang berisi 0,1 ml larutan SDS 10 %; 0,8 ml HCL 0,1N dan 1,0 ml TBA 1 % ; selanjutnya campuran tersebut dipanaskan 95°C selama 45 menit dan diperoleh larutan berwarna kemerahan ( jingga ) . TBARS yang berwarna jingga diekstraksi dengan n- butanol untuk diamati. Selanjutnya larutan tersebut diamati untuk memperoleh panjang gelombang maksimum eksitasi dan emisi maka dilakukan pembacaan panjang gelombang 400 - 700 nm terhadap intensitas warna.

Dari pengamatan dengan spektrofluorometer diperoleh panjang gelombang eksitasi maksimum dan emisi maksimum sebagai berikut  
( Gambar 5.21 ) :



Gambar 5.21 Kurva antara Panjang Gelombang dan Intensitas warna  
(1) Pita panjang gelombang Eksitasi ( -.-.-.- ) dan  
(2) Emisi ( \_\_\_\_\_ )

Dari larutan TBARS yang diperoleh diatas yang dianggap sebagai 100% ; selanjutnya dilakukan pengenceran dengan berbagai kadar untuk pembuatan kurva linieritas dan pembacaan pada  $\lambda$  Eksitasi maksimum = 539 nm dan  $\lambda$  Emisi pada 400 nm sampai 700 nm adalah sebagai berikut ( Gambar 5.22 ) :



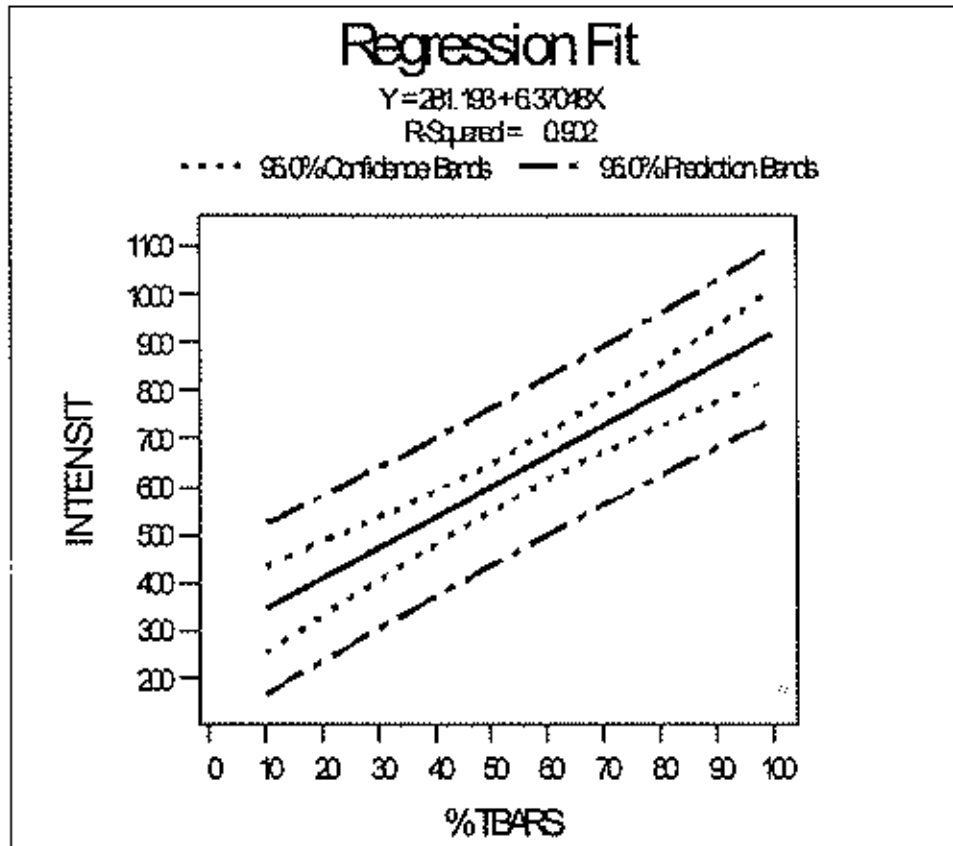
Gambar 5.22 Spektrum Intensitas Warna dari Berbagai Kadar TBARS pada  $\lambda$ Eks. = 539 nm dan  $\lambda$  Em. = 200 - 700 nm.

Pembacaan besarnya intensitas warna pada  $\lambda_{\text{EKS.}} = 539$  nm dan  $\lambda_{\text{EM.}} = 549$  adalah sebagai berikut ( Tabel 5.16 ) :

Tabel 5.16 Hasil Pembacaan Intensitas warna pada  $\lambda$  Eks.=539 nm dan  $\lambda$  Em. = 549 nm.

NO.	Kadar MDA	Intensitas warna
1	100	835,1
2	90	814,5
3	80	794,9
4	70	773,2
5	60	717,1
6	50	675,0
7	40	594,3
8	30	493,2
9	20	386,1
10	10	232,3

Dari hasil pembacaan intensitas warna pada panjang gelombang eksitasi dan emisi maksimum ( Tabel 5.16 ) dibuat kurva linieritas adalah sebagai berikut ( Gambar 5.23 ) :



Gambar 5.23 Kurva Baku antara Kadar MDA-TBA (TBARS) dan Intensitas warna pada  $\lambda_{Eks.} = 539 \text{ nm}$  dan  $\lambda_{Em.} = 549 \text{ nm}$ .

Dari kurva baku antara kadar dan intensitas warna ( Gambar 5.23 ) diperoleh persamaan regresi linier yaitu :  $Y = 281,198 + 6.37048 X$  dan  $r = 0,950$

## 5.6 Analisa data % Aktivitas Antiperoksida Lemak dari Skualena Isolat ; skualena Baku dan $\alpha$ - Tokoferol

Dengan penambahan masing - masing zat aktif ( skualena isolat ; skualena baku dan  $\alpha$  - tokoferol ) pada larutan uji menunjukkan penurunan intensitas warna yaitu warna jingga semakin memucat dengan meningkatnya kadar zat aktif , ini berarti terjadi penurunan pembentukan senyawa MDA.

Hasil uji aktivitas antiperoksida lemak dari tiga sampel yaitu skualena isolat, skualena baku dan  $\alpha$  - tokoferol ( Tabel 5.17.) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.17. % Aktivitas Antiperoksida Lemak dari Skualena Isolat ;  
Skualena baku dan  $\alpha$  - Tokoferol

No.	% Aktivitas Antiperoksida lemak / ppm bahan		
	Skualena Isolat(1)	Skualena baku(2)	$\alpha$ - Tokoferol (3)
1	0,271	0,496	1,257
2	0,266	0,484	1,178
3	0,282	0,590	1,003
4	0,300	0,624	0,942
5	0,323	0,726	0,860
$\bar{X}$	0,288	0,584	1,048
SD	0,023	0,099	0,165

Berdasarkan data tersebut ( Tabel 5.17.) dilakukan uji Anava satu arah. Hasilnya (Tabel 5.18 ) adalah sebagai berikut :

Tabel 5.18. Tabel Analisa Varian

Sumber variasi	D.F.	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F. Prop.
Perlakuan	2	1,4658	0,7329	58,1954	0.0000
Sisa	12	0,1511	0,0126		
Total	14	1,6170			

Dari perhitungan ( Tabel 5.18 ) diperoleh  $P = 0,000 < 0,05$  , jadi ada perbedaan bermakna antar perlakuan , maka selanjutnya dilakukan uji LSD sebagai berikut ( Tabel 5.19 ) :

Tabel 5.19 Tabel Perbedaan Rata - rata tiap perlakuan

	SK. Isolat	SK . baku	$\alpha$ - Tokoferol
SK Isolat	0	0,2957 *	0,7595 *
SK Baku	0,2957 *	0	0,4638 *
$\alpha$ - Tokoferol	0,7595 *	0,4638 *	0
LSD = 0,0774			

#### Keterangan

\* = berbeda makna dan SK = skualena

Dari hasil analisis secara Anava satu arah ada perbedaan bermakna % aktivitas antiperoksida lemak antara skualena isolat , skualena baku dan  $\alpha$  - tokoferol secara berurutan adalah sebagai berikut :  $0,2884 \pm 0,023$  % ;  $0,584 \pm 0,099$  % dan  $1,048 \pm 0,1655$  %





## BAB 6

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Isolasi dan pemurnian skualena

Isolasi skualena dengan bahan dasar minyak hati ikan Hiu yang diperoleh dari nelayan daerah Pantai Sendang Biru Malang Selatan berwarna coklat kekuningan, dilakukan dengan reaksi penyabunan yang menggunakan kalium hidroksida (KOH) dalam etanol (AOAC, 1995). Dalam proses ini akan terjadi pemisahan antara fase tersabunkan dan tak tersabunkan, dimana fase tersabunkan mengandung asam lemak yang memiliki gugus karboksil ( $-COOH$ ) berwarna coklat tua dan skualena yang tidak mempunyai gugus karboksil masuk dalam fase tak tersabunkan berwarna kekuningan. Pemisahan ini terjadi akibat adanya perbedaan polaritas dari kedua fase tersebut, dimana asam lemak yang bereaksi dengan KOH akan membentuk garam yang bersifat polar dan skualena kasar bersifat nonpolar masuk ke fase heksana.

Pemurnian skualena kasar dilakukan dengan kromatografi kolom berisi silika yang bertindak sebagai fase diam, sedangkan fase gerak digunakan heksana. Dalam pemurnian ini skualena nonpolar larut dalam fase gerak akan langsung tereluasi sehingga terpisahkan dengan pengotor lain yang teradsorpsi oleh fase diam, hal ini terlihat dari perubahan warna fase diam yang semula putih menjadi kuning. Selanjutnya dilakukan

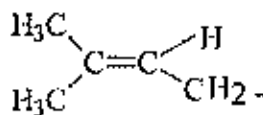
pemekatan skualena dengan rotapavor untuk menguapkan fase gerak heksana, setelah tidak menetes lagi skualena yang diperoleh dialiri gas nitrogen, kemudian ditimbang. Dari  $\pm 5,000$  gram minyak hati ikan hiu Cucut Botol diperoleh skualena  $3,867 \pm 0,093$  gram atau sama dengan  $75,830 \pm 1,140$  %

## 6.2. Identifikasi Skualena ( Isolat )

Identifikasi skualena murni dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapisan tipis (KLT) ; spektroskopi infra merah (IR) , kromatografi gas- spektroskopi massa ( GC-MS) dan spektroskopi Resonansi Magnetik Inti (RMI) .

Identifikasi dengan kromatografi lapisan tipis dengan fase geraknya heksana diperoleh satu noda dengan  $R_f = 3,20/7,00 = 0,457$  . , skualena baku  $R_f = 3,20/7,00 = 0,457$  , adisi isolat dan skualena baku  $R_f = 3,20/7,00 = 0,457$  ; jadi isolat identik dengan skualena baku

Identifikasi dengan spektroskopi infra merah dari Skualena Isolat dan Skualena baku

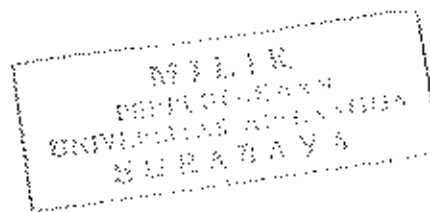


Skualena terdiri dari 6 unit isoprenil sehingga pada identifikasi dengan infra merah ( IR ) dan Resonansi Magnetik Inti (RMI) yang terlihat sepertinya satu unit tersebut .

Pada pengamatan ini diperoleh puncak - puncak yang menunjukkan bilangan gelombang yang sama (Gambar 5.2 ; 5.3 dan 5.4 ) antara isolat dan skualena baku, jadi keduanya sama yaitu 1 unit isoprenil . Bilangan gelombang 1379 menunjukkan adanya percabangan menjadi bentuk iso . Bilangan gelombang 833 menunjukkan trisubstitusi dari gugus vinil dimana empat atom hidrogen yang ada tiga digantikan dengan karbon ( alkil dan alkilena ).

Identifikasi kromatografi gas diperoleh satu puncak baik isolat maupun baku yaitu untuk isolat mempunyai waktu retensi = 9,065 menit dan baku 9,124 menit perbedaan waktu ini terjadi karena antara injektor tidak ada hubungan langsung dengan rekorder, sehingga waktu mulainya tidak bersamaan. Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan skualena baku secara kromatografi gas (Gambar 5.5 dan 5.6)

Sedangkan untuk identifikasi skualena (  $C_{30}H_{50}$  ) menggunakan kromatografi gas - spektroskopi massa; dengan GC tersebut isolat menunjukkan satu puncak (Gambar 5.7) dan puncak tersebut diperiksa spektrum massanya menunjukkan fragmen - fragmen yang mirip dengan informasi seyawa skualena yang ada didalam alat tersebut berarti isolat memang skualena ; puncak tertinggi mempunyai  $m/e = 69,3$  yaitu  $C_5H_9$  seperenam dari  $m/e$  total berarti 1 unit isoprenil dan  $m/e$  total = 410 (  $C_{30}H_{50}$  ) ( Gambar 5.8 dan 5.9)



Identifikasi dengan RMI, baik isolat maupun skualena baku dilarutkan dalam sebuah tabung dengan 0,50 ml  $\text{CDCl}_3$ , kemudian dimasukkan kedalam medan magnet dari instrumen dan diputar. Dasar kerja dari RMI adalah penyerapan gelombang radio oleh inti - inti tertentu dalam molekul organik, apabila molekul berada dalam medan magnet. Adanya pengaruh medan magnet tersebut maka inti molekul yang semula tidak teratur posisinya akan berubah menjadi searah (paralel) dan yang menyerap energi lebih tinggi akan berposisi berlawanan arah (anti paralel) dengan medan magnet; setiap proton atau karbon dalam molekul yang mempunyai lingkungan kimia berbeda akan memberikan resonansi yang berbeda sehingga harga pergeseran kimianya ( $\delta$ ) berbeda pula (Silverstein, 1991).

Hasil identifikasi menunjukkan adanya sedikit perbedaan dari pergeseran kimia baik pada proton maupun karbon disebabkan kemungkinan adanya perbedaan struktur dari skualena isolat dan skualena baku yaitu isolat yang berasal dari alam berposisi trans - trans - trans; sedangkan yang sintesis trans - sis - trans (Merck Index, 1995), banyak lagi gambaran isomer dari skualena (Gambar 2.1 sampai Gambar 2.6).

Pergeseran kimia dari C-2 berbeda dengan C-6 dan C-10, hal ini karena lingkungannya berbeda C-6 dan C-10 lebih terperisai dibanding C-2, sehingga C-6 dan C-10 lebih ke kiri (upfield). Jadi berdasarkan geseran kimianya isolat identik dengan skualena baku

Berdasarkan identifikasi isolat dan skualena baku dengan KLT; IR ; RMI ; GC dan MS maka dapat disimpulkan bahwa isolat identik dengan skualena baku.

### **6.3 Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH oleh skualena isolat ; skualena baku dan $\alpha$ -tokoferol .**

Untuk mempermudah perhitungan dan pengambilan kesimpulan, maka dilakukan perhitungan % aktivitas peredaman per ppm yang merupakan ciri spesifik dari masing - masing bahan aktif ; selanjutnya dihitung luas area dibawah kurva dari kurva antara % peredaman DPPH dan waktu yaitu dari 0,0 jam sampai 5,0 jam kemudian dijumlahkan sehingga diperoleh enam data dari enam kali percobaan.

Dari hasil pengamatan dan perhitungan diperoleh rata-rata % aktivitas peredaman radikal DPPH isolat dengan kadar yang sama satu ppm yaitu  $0,00031 \pm 0,00014$  % lebih kecil dari skualena baku  $0,00405 \pm 0,00006$  % tetapi tidak berbeda makna, sedangkan  $\alpha$ - tokoferol mempunyai aktivitas antiradikal DPPH  $13,14867 \pm 1,04648$  % menunjukkan perbedaan bermakna dengan kedua skualena. Perbedaan yang besar antara dua skualena dan  $\alpha$ - tokoferol hal ini disebabkan  $\alpha$ - tokoferol lebih mudah dan lebih cepat melepaskan elektronnya (  $\cdot H$  ) terlihat dari waktu awal pencampuran antara radikal DPPH dan  $\alpha$ -tokoferol ( 0,0 jam ) langsung terlihat perubahan

intensitas warna dari DPPH , sedangkan skualena memerlukan waktu yang lebih lama dalam memberikan efek serta adanya resonansi dari  $\alpha$ -tokoferol memberikan dorongan pada gugus fenolnya untuk melepas elektronnya yang berupa atom H (Gambar 3.5) dan radikal  $\alpha$ -tokoferol bersifat stabil ( De Luca C. et all.,1996 ) dibanding dengan ikatan rangkap pada molekul skualena meskipun jumlahnya enam.

#### **6.4. Uji aktivitas antiperoksida lemak oleh skualena isolat ; skualena baku dan $\alpha$ -tokoferol .**

Untuk mempermudah perhitungan dan membandingkan % aktivitas antiperoksida maka dilakukan perhitungan % aktivitas masing - masing bahan aktif per ppm. Dari hasil pengamatan tiga bahan aktif ( isolat; skualena baku dan  $\alpha$ - tokoferol ) yang masing - masing dilakukan replikasi lima kali . Dari lima kali pengamatan dilakukan perhitungan rata - rata maka diperoleh % aktivitas antiperoksida lemak dari isolat (  $0,288 \pm 0,023$  % / ppm ) lebih kecil dari skualena baku (  $0,584 \pm 0,099$  % / ppm ) hal ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan struktur dari keduanya yaitu posisi trans -trans -trans dari isolat dan posisi trans - sis - trans dari skualena baku hal ini menunjukkan molekul skualena baku lebih mudah melepaskan elektronnya (H). Sedangkan perbedaan aktivitas yang besar antara keduanya dengan  $\alpha$ -tokoferol (  $1,048 \pm 0,165$  % / ppm ) hal ini disebabkan oleh  $\alpha$ -tokoferol lebih

mudah dan lebih cepat melepaskan elektronnya ( 'H ) karena adanya efek resonansi dari  $\alpha$ -tokoferol (Gambar 3.5) dan radikal  $\alpha$ -tokoferol stabil ( De Luca C. et all.,1996) dibanding dengan ikatan rangkap pada molekul skualena meskipun jumlahnya enam.

Dari hasil pengamatan % aktivitas spesifik antiradikal bebas DPPH dari isolat dan skualena baku ternyata lebih kecil dibanding % aktivitas spesifik antiperoksida lemak ; hal ini membuktikan bahwa reaksi antara skualena dan DPPH yang hanya merupakan reaksi kimia biasa tanpa dipengaruhi oleh faktor lain berlangsung lama dan lemah. Sedangkan dalam homogenat lever yang merupakan media biologis % aktivitas spesifiknya meningkat, hal ini kemungkinan adanya pengaruh enzim yang ada dalam media tersebut yang meningkatkan kerja dari skualena untuk meredam atau menghambat terjadinya peroksida lemak yang ditunjukkan dengan menurunnya kadar TBARS ( MDA ).

Persen aktivitas antiradikal DPPH yang sangat kecil dari skualena baku maupun isolat ini menunjukkan bahwa DPPH bukan model yang cocok untuk membuktikan sifat antiradikal yang baik dari skualena, tetapi senyawa tersebut sangat baik untuk zat yang bersifat radikal atau zat yang mudah melepaskan elektronnya seperti  $\alpha$ -tokoferol, katekol ( Sykes Peter,1987). ,

Sedangkan % aktivitas spesifik antiradikal DPPH dari  $\alpha$ -tokoferol lebih besar dari % aktivitas spesifik antiperoksida lemak, hal ini menunjukkan



bahwa reaksi kimia dari  $\alpha$ -tokoferol dengan radikal DPPH berlangsung mudah dan cepat dibanding dalam media biologis. Dalam pelarut etanol  $\alpha$ -tokoferol larut dan dalam keadaan bebas, sedangkan dalam media biologis  $\alpha$ -tokoferol berikatan dengan membran sel ( lipid-soluble ), sehingga dia tidak dalam keadaan bebas yang berakibat kecepatan reaksinya lambat dan lebih kecil dibanding dengan reaksi kimia biasa ( Rice -Evans, 1991).



**BAB 7****KESIMPULAN DAN SARAN****7.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diuraikan di atas maka dapat ditarik kesimpulan :

1. Dengan uji radikal bebas menggunakan Difenil Pikril Hidrazil ternyata besarnya aktivitas antiradikal Isolat dan skualena baku tidak ada perbedaan bermakna, sedangkan aktivitas antiradikal skualena isolat dan skualena baku ada perbedaan bermakna dengan  $\alpha$ - tokoferol . Adapun aktivitas antiradikal DPPH per ppm dari skualena isolat ; skualena baku dan  $\alpha$  -tokoferol secara berurutan masing - masing adalah :  $0,00031 \pm 0,00014$  % ;  $0,00405 \pm 0,00006$  % dan  $13,14867 \pm 1,04648$  % (  $\bar{X} \pm SD$  )
2. Dengan uji aktivitas antiperoksida lemak ternyata besarnya aktivitas antiperoksida dari isolat; skualena baku dan  $\alpha$ - tokoferol masing - masing ada perbedaan bermakna. Adapun aktivitas antiperoksida lemak per ppm dari isolat ; skualena baku dan  $\alpha$ - tokoferol secara berurutan masing - masing adalah :  $0,2884 \pm 0,0233$  % ;  $0,5841 \pm 0,0994$  % dan  $1,0479 \pm 0,1652$  %

## 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian di atas maka disarankan :

1. Mencari model antiradikal yang cocok untuk skualena secara reaksi kimia biasa selain DPPH.
2. Perlu diteliti lebih jauh secara *in vivo* aktivitas skualena sebagai antiradikal bebas dan antiperoksida lemaknya . Untuk memberikan bukti ilmiah kepada masyarakat, karena dipasaran sudah banyak beredar beberapa merek dagang dari skualena yang dipercaya dapat menyembuhkan beberapa penyakit yang ditengaraï sebagai akibat adanya radikal bebas.





## DAFTAR PUSTAKA

- Andriyany S.V., 1995. Isolasi squalen dari minyak hati ikan Hiu Cucut Botol (*Centrophorus* sp) & pemurniannya menggunakan tehnik ekstraksi fluida CO<sub>2</sub> superkritik. Skripsi, ITS, Surabaya, hlm 14-17.
- Bast Aalt, Haenen Guido R M M and Doelman Cees J.A, 1991. Oxidants and Antioxidants: State of the Art. Crystal, R.G. and Bast, A. (eds.), The American Journal of Medicine. Proceedings of a Symposium. Oxidants and Antioxidants: Pathophysiologic Determinants and Therapeutic Agents, 3c-2s-12s.
- Breitmaier E , Voelter W., 1978. <sup>13</sup> C NMR Spectroscopy. Methods and Applications in Organic Chemistry. Second Edition, pp 221-223.
- Budiarso I.T, 1992. " Mega Squalen : Ekstrak Hati Ikan Hiu Botol yang Ajaib. Pusat Penelitian Penyakit Menular. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hlm 1-6.
- Budiarso IT, 1992. Squalen Obat 'Dewa' dari Ikan Hiu. Jakarta: Harian Kompas, 8 Oktober, hlm 10.
- Budiarso IT, 1992. Squalen, Alternatif Penangkal Penyakit. Jakarta: Intisari, Desember, hlm
- Campagno, 1984. FAO Spesies Catalogue. FOA Fisheries Synopsis. 4 (125), pp 36,43.
- Cuendet Muriel, Hostettmann Kurt, Potterat Olivier and Dyatmiko Wahjo, 1997. Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. Helvetica Chimica Acta 80. pp 1144-1152.
- Desai KN, Wei H, Lamartiniere CA, 1996. The preventive and therapeutic potensial of the squalene-containing compound, Roindex, on tumor promotion and regression. Cancer-Lett, 101(1): pp.93-6.
- De Luca C, Picardo M, Breathnach A, Passi S, 1996. Lipoperoxidase activity of Pityrosporum: Characterisation of by-products and possible role in pityriasis versicolor. Exp. Dermatol, 5(1): pp 49-56

- Formo W Marvin, Jungermabb Eric et al, 1979. *Bailey's Industrial Oil And Fat Products*. volume 1 fourth edition. Toronto :John Wiley & Sons
- Fry RJ 1988. *Metabolism of Xenobiotics in Isolated Cells : Comparison with other In Vitro Systems and In Vivo*, In : Gorrod, J.W., Oelschlager, H., Caldwell J. (eds.) *Metabolism of Xenobiotics*. Taylor and Francis, London-New York-Philadelphia, 303-305.
- Halliwell B. 1991. *Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease*. Crystal RG and Bast A (eds.). *The American Journal of Medicine, Proceedings of a Symposium. Oxidants and Antioxidants: Pathophysiologic Determinants and Therapeutic Agents*, 3c-14s-20s.
- Hesse Manfred, Meier Herbert , Zeeh Bernd ,1987. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.New York ,171; pp 245 - 259
- Joyeux Michel, Rolland Alain, Fleurentin Jacques et al, 1990. *Ter-Butyl Hydroperoxide-Induced Injury in Isolated Rat Hepatocytes: As Model for Studying Anti-Hepatotoxic Crude Drugs*. *Planta Medica* 56. pp 171-174.
- Joyeux Michel, Mortier F, Fleurentin J, 1995. *Screening of Antiradical, Antilipoperoxidant and Hepatoprotective Effects of Nine Plant Extracts Used in Caribbean Folk Medicine*. *Phytotherapy Research* 9 , pp 228-230.
- Kohno Y, Egawa Y, Itoh S et al,1995. *Kenetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in n-butanol*. *Biochim-Biophys-Acta* 1256 (1) : pp 52-6.
- Marner Franz-Josef, Gladtko Dieter, Jaenicke Lothar, 1988. *Studies On The Biosynthesis Of Iridals And Cycloiridals*. *Helv.Chim.Acta*,71, N5, 1331-1338.
- Masuyama Yoshiro, Yamada Kohji, Kurusu Yasuhiko,1995. *Hexacarbonyl(mol Yboenum(o) -Induced Desulfonylation Of Allylic Sulfones: Nucleophilic Substitution And Reductive Desulfonylation*. *Chem.Express*,2,N11,C. pp 687-690.
- Mathiesen Liv, Malterud Egil Karl and Sund Bredo Reidar, 1995. *Antioxidant Activity of Fruit Exudate and C-Methylated Dihydrochalcones from Myrica gale*. *Planta Med*.61, pp 515-518.

- Mulja Muhammad, Sharman 1995. Analisis Instrumental. Surabaya. Airlangga University Press, hlm 26-258
- Murray RK, Granner DK, Meyes P.A et al, 1990. Harper's Biochemistry, 23th edition, New York : Prentice-hall International Inc. pp 143-163
- Official Method of Analysis of AOAC International , 16th, Vol II, AOAC International, Chap. 41, pp 30-32.
- Pill J, Aufenanger J, Stegmeier K, Schmidt FH, Muller D, 1987. Thin-Layer Chromatography Of Radioactively Labelled Cholesterol And Precursors From Biological Material. A Simple And Sensitive Method For Investigating Actions On The Pathway. Fresenius Z. Anal. Chem., 327, N 5-6, 558-560
- Pine, Stanley H., James B. Hendrickson, Donald J. Cram dan George S. Hammond, 1988. Kimia Organik I&II. edisi keempat , Bandung : Penerbit ITB. hlm 925, 954 - 959, 962, 979
- Retnowati Rurini. 1994. Isolasi Skualen Dari Minyak Hati Ikan Hiu Dan Konversinya Menjadi Skualan. Tesis, Proram Magister Kimia, Program Pasca Sarjana, ITB, Bandung.
- Rice-Evans A Catherine, Diplock T Anthony, Symons RC Martyn, 1991. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Techniques in Free Radical Research . Volume 22, Amsterdam: Edited by Burdon H.R. pp 1-10, 37-48
- Sano Mitsuaki, Takahashi Yutaka, Yoshino Kyoji et al, 1995. Effect Of Tea (*Camellia sinensis* L.) on Lipid Peroxidation in Rat Liver and Kidney: a Comparason of Green and Black Tea Feeding. Biol. Pharm. Bull 18(7), pp 1006-1008.
- Sasaoka Shin-ichi , Yamamoto Taku., Kinoshita Hideki., Inomata Katsuhiko., Kotake Hiroshi. 1985. Palladium-Catalyzed Coupling Of Allylic Acetates With Zinc. Chem Lett. N 3, pp 315-318.
- Sen Stephanie E., Prestwich Glenn D, 1989. Squalene Analogues Containing Isopropylidene Mimics As Potential Inhibitors of Pig Liver Squalene Epoxidase And Oxidosqualene Cyclase. J. Med. Chem. 32, N, C. pp 2152
- Shargel Leon, Yu Andrew BC, 1980. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. New York: Appleton -Century - Croft. pp 68-77



- Simon Seibl Clerc Pretsch ,1989. Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds. Second Edition , Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Silver Stein RM, Bassler Clayton, Morrill Terencee, 1991. Spectrometric Identifikasi of Organic Compounds. Fifth Edition , John Wiley & Son's Inc New York .
- Sykes Peter, 1975 . A Guide to mekanisme in organic chemistry, fourth edition , London : Longman Group. pp 294-305.
- Suprayitno Eddy, 1995. Peningkatan Rendemen dan Kualitas Minyak Hati Ikan Cucut (*Centrophorus squamosus*) dengan Teknik Ekstraksi Enzimatis. Studi optimasi kondisi kerja enzim papain dan bromelin, Desertasi, Program Doktor Ilmu Matematika Dan Sains, Program Pasca Sarjana, UNAIR, Surabaya, hlm 15
- Tripathi Y B, Shukla Savita, Sharma Mukta and Shukla VK, 1995. Antioxidant Property of *Rubia cordifolia* Extract and its Comparison with Vitamin E and Parabenzquinone. *Phytotherapy Research*.9, pp 440-443.
- The Merck Index. 1989. An Encyclophedi , pp 1383.
- Wijaya Andi, 1996. Radikal bebas dan Parameter Status Antioksidan. *Forum Diagnosticum* 1.
- Yamasaki Kazuya, Hashimoto Akio, Kokusenya Yoshio, Miyamoto Takaaki and Sato Tadashi, 1994. Electrochemical Method for Estimating the Antioxidative Effects of Methanol Extracts of Crude Drugs. *Chem Pharm Bull*. 42(8) . pp 1663-1665.
- Yoshino Kyoji, Hara Yukihiko, Sano Mitsuaki and Tomita Isao, 1994. Antioxidative Effects of Black Tea Theaflavins and Thearubigin on Lipid Peroxidation of Rat Liver Homogenates Induced by *ter*-Butyl Hydroperoxide. *Biol Pharm Bull*. 17(1) , pp 146-149.
- Yunizal dan S Nasran, 1982. Ekstraksi Minyak Hati Ikan Cucut dengan Silase asam. Jakarta: LPTP, No 16, BPTP, Deptan. hlm 2.
- Yunizal dan S Nasran, 1984. Studi Pendahuluan Tentang Kadar Skualen Dalam Berbagai Minyak Hati Cucut. Jakarta: LPTP, No. 32, BPTP, Deptan. hlm 17-20.



Hasil Pengamatan dan perhitungan Aktivitas Antiradikal bebas DPPH oleh Larutan Skualena Baku dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  517

No.	DPPH % b/v	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	4,120.10 <sup>-3</sup>	0,838	-	0,819	-	0,805	-	0,800	-	0,798	-	0,790	-
2	3,920.10 <sup>-3</sup>	0,850	-	0,848	-	0,836	-	0,830	-	0,828	-	0,825	-
3	4,100.10 <sup>-3</sup>	0,885	-	0,885	-	0,885	-	0,885	-	0,885	-	0,885	-
4	3,840.10 <sup>-3</sup>	0,855	-	0,853	-	0,850	-	0,843	-	0,837	-	0,830	-
5	4,060.10 <sup>-3</sup>	0,893	-	0,893	-	0,888	-	0,883	-	0,863	-	0,856	-
6	4,008.10 <sup>-3</sup>	0,864	-	0,860	-	0,853	-	0,848	-	0,842	-	0,837	-
SD	0,122.10 <sup>-3</sup>	0,024	-	0,030	-	0,035	-	0,036	-	0,033	-	0,036	-
KV	3,048	2,735	-	3,484	-	4,084	-	4,270	-	3,959	-	4,251	-
No.	Skualena baku(ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	20195,800	0,715	14,677	0,698	14,774	0,680	15,528	0,672	16,000	0,663	16,917	0,642	18,734
2	20356,200	0,709	16,588	0,703	17,099	0,690	17,464	0,682	17,831	0,678	18,116	0,675	18,182
3	20112,400	0,770	12,994	0,765	13,559	0,760	14,124	0,755	14,689	0,748	15,480	0,739	16,384
4	20128,600	0,728	14,854	0,721	15,475	0,718	15,529	0,714	15,303	0,710	15,173	0,702	15,422
5	20012,200	0,741	17,021	0,738	17,357	0,730	19,793	0,725	17,894	0,708	17,961	0,703	17,874
X	20161,040	0,733	15,227	0,725	15,653	0,716	16,488	0,710	16,343	0,701	16,729	0,692	17,319
SD	127,345	0,024	1,620	0,027	1,596	0,032	2,197	0,034	1,462	0,033	1,366	0,037	1,372
KV	0,632	3,314	10,640	3,776	10,194	4,378	13,325	4,723	8,948	4,681	8,162	5,264	7,921

## Lanjutan

No.	Skualena Baku (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	40391,600	0,586	30,072	0,564	31,136	0,535	33,540	0,521	34,875	0,516	35,338	0,510	35,443
2	40712,200	0,577	32,118	0,575	32,193	0,566	32,410	0,561	32,410	0,557	32,730	0,553	32,970
3	40224,800	0,643	27,345	0,636	28,136	0,630	28,814	0,626	29,266	0,620	29,944	0,610	31,074
4	40257,200	0,604	29,357	0,601	29,534	0,597	29,765	0,590	30,012	0,581	30,585	0,575	30,723
5	40024,400	0,603	32,475	0,600	32,811	0,593	33,221	0,587	33,522	0,570	33,951	0,560	34,579
6	40322,080	0,603	30,273	0,595	30,762	0,584	31,550	0,577	32,017	0,569	32,510	0,562	32,958
SD	254,691	0,025	2,104	0,028	1,923	0,036	2,131	0,039	2,355	0,038	2,259	0,036	2,083
KV	0,632	4,202	6,950	4,679	6,251	6,107	6,754	6,747	7,354	6,636	6,949	6,458	6,319
No.	Skualena Baku (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	50489,500	0,502	40,095	0,478	41,636	0,468	41,863	0,521	41,875	0,516	42,105	0,510	42,279
2	50890,500	0,503	40,824	0,500	41,038	0,491	41,268	0,484	41,687	0,480	42,029	0,478	42,046
3	50281,000	0,545	38,418	0,540	38,983	0,535	39,548	0,530	40,113	0,526	40,565	0,505	42,938
4	50321,500	0,533	37,661	0,526	38,335	0,512	39,765	0,508	39,739	0,503	39,901	0,497	40,121
5	50030,500	0,543	39,194	0,541	39,418	0,534	39,865	0,527	40,317	0,498	42,294	0,492	42,523
SD	50402,600	0,525	39,238	0,517	39,882	0,508	40,462	0,514	40,746	0,505	41,379	0,496	41,981
KV	318,363	0,021	1,266	0,027	1,399	0,029	1,036	0,019	0,969	0,018	1,076	0,012	1,091
	0,632	4,040	3,227	5,294	3,508	5,663	2,560	3,653	2,379	3,488	2,601	2,502	2,599

## Lanjutan

No.	Skualena baku (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	60587,400	0,440	47,494	0,426	48,985	0,418	48,075	0,415	48,125	0,405	49,248	0,400	49,367
2	61068,600	0,431	49,294	0,428	49,528	0,419	49,880	0,411	50,482	0,403	51,329	0,400	51,515
3	60337,200	0,479	45,876	0,462	47,797	0,454	48,701	0,449	49,266	0,444	49,831	0,439	50,396
4	60385,800	0,468	45,263	0,445	47,832	0,433	49,059	0,423	49,822	0,413	50,657	0,402	51,566
5	60036,600	0,459	48,600	0,454	49,160	0,445	49,887	0,440	50,170	0,420	51,133	0,413	51,752
6	60483,120	0,455	47,305	0,443	48,660	0,434	49,120	0,428	49,573	0,417	50,440	0,411	50,919
SD	382,036	0,020	1,723	0,016	0,797	0,016	0,781	0,016	0,927	0,017	0,882	0,017	1,019
KV	0,632	4,338	3,643	3,569	1,637	3,650	1,589	3,820	1,870	3,966	1,748	4,057	2,000
No.	Skualena baku (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
1	70685,300	0,375	55,251	0,364	55,556	0,355	55,901	0,350	56,250	0,345	56,767	0,340	56,962
2	71246,700	0,369	56,588	0,366	56,840	0,360	56,938	0,354	57,349	0,350	57,730	0,347	57,939
3	70393,400	0,444	49,831	0,437	50,622	0,432	51,187	0,425	51,977	0,420	52,542	0,410	53,672
4	70450,100	0,422	50,643	0,399	53,224	0,387	54,471	0,379	55,042	0,374	55,317	0,362	56,386
5	70042,700	0,392	56,103	0,381	57,335	0,370	58,333	0,362	59,003	0,334	61,300	0,327	61,800
SD	70563,640	0,400	53,683	0,389	54,715	0,381	55,366	0,374	55,924	0,365	56,731	0,357	57,352
KV	445,708	0,031	3,195	0,030	2,787	0,031	2,731	0,031	2,645	0,034	3,218	0,032	2,948
	0,632	7,824	5,952	7,127	5,093	8,173	4,932	8,182	4,729	9,393	5,672	8,988	5,140

## Lanjutan

No.	Skualena Baku (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	80783,200	0,290	65,394	0,288	65,835	0,272	66,211	0,261	67,375	0,258	67,669	0,250	68,354
2	81424,800	0,291	65,765	0,289	65,920	0,281	66,388	0,275	66,867	0,270	67,391	0,267	67,636
3	80449,600	0,336	62,034	0,306	65,424	0,298	66,328	0,289	67,345	0,285	67,797	0,280	68,362
4	80514,400	0,335	60,819	0,299	64,947	0,282	66,824	0,272	67,734	0,264	68,459	0,257	69,036
5	80048,800	0,329	63,158	0,316	64,614	0,302	65,991	0,293	66,818	0,265	69,293	0,257	69,977
6	80644,160	0,316	63,434	0,300	65,348	0,287	66,348	0,278	67,228	0,268	68,122	0,262	68,673
SD	509,381	0,024	2,130	0,012	0,563	0,013	0,306	0,013	0,384	0,010	0,763	0,012	0,881
KV	0,632	7,469	3,358	3,939	0,862	4,380	0,461	4,676	0,571	3,731	1,120	4,580	1,283

Keterangan : A = Absorpsi dan P = Peredaman

Contoh perhitungan % aktivitas peredaman

Ab = absorpsi blanko ; As = Absorpsi sampel

$$\% P = \{ ( 1 - As / Ab ) 100 \% \}$$

% P pada 60 menit dari skualena baku 80048,800 ppm =  $\{ ( 1 - 0,316 / 0,893 ) 100 \% \} = 64,614 \%$

Perhitungan % P per ppm =  $64,624 / 80048,800 = 8,073 \cdot 10^{-4}$



## Lampiran 2

Hasil Pengamatan dan perhitungan Aktivitas Antriradikal bebas DPPH oleh Larutan Skualena Isolat dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada  $\lambda$ : 517

No.	DPPH % b/v	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	4,080.10 <sup>-3</sup>	0,945	-	0,942	-	0,940	-	0,939	-	0,937	-	0,935	-
2	4,140.10 <sup>-3</sup>	0,967	-	0,966	-	0,964	-	0,961	-	0,960	-	0,958	-
3	4,080.10 <sup>-3</sup>	0,938	-	0,935	-	0,933	-	0,930	-	0,927	-	0,925	-
4	4,024.10 <sup>-3</sup>	0,888	-	0,885	-	0,880	-	0,877	-	0,875	-	0,870	-
5	4,012.10 <sup>-3</sup>	0,876	-	0,874	-	0,872	-	0,871	-	0,869	-	0,866	-
X	4,067.10 <sup>-3</sup>	0,923	-	0,920	-	0,918	-	0,916	-	0,914	-	0,911	-
SD	0,051.10 <sup>-1</sup>	0,039	-	0,039	-	0,040	-	0,040	-	0,040	-	0,041	-
KV	1,262	4,225	-	4,266	-	4,353	-	4,333	-	4,364	-	4,489	-
No.	Skualena isolat (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	50060,000	0,994	0,106	0,941	0,106	0,937	0,319	0,923	1,704	0,903	3,627	0,892	4,599
2	50065,000	0,966	0,103	0,965	0,107	0,960	0,429	0,944	1,769	0,927	3,438	0,919	4,071
3	50045,000	0,937	0,107	0,934	0,107	0,929	0,429	0,915	1,613	0,898	3,128	0,885	4,324
4	49825,000	0,887	0,113	0,884	0,113	0,875	0,568	0,863	1,596	0,845	3,429	0,833	4,253
5	49350,000	0,875	0,114	0,873	0,114	0,867	0,573	0,855	1,837	0,838	3,567	0,825	4,734
X	49869,000	0,932	0,109	0,919	0,109	0,914	0,464	0,900	1,704	0,882	3,438	0,871	4,396
SD	307,071	0,051	0,005	0,039	0,004	0,041	0,107	0,039	0,102	0,039	0,193	0,040	0,268
KV	0,616	5,446	4,348	4,270	3,457	4,446	23,175	4,333	6,004	4,400	5,606	4,630	6,090

## Lanjutan

No.	Skualena isolat (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	100120,000	0,943	0,212	0,939	0,319	0,931	0,958	0,890	5,218	0,866	7,577	0,858	8,235
2	100130,000	0,965	0,207	0,963	0,321	0,953	0,965	0,908	5,515	0,886	7,708	0,873	8,873
3	100090,000	0,936	0,213	0,932	0,321	0,924	0,965	0,883	5,054	0,860	7,228	0,852	7,892
4	99650,000	0,886	0,225	0,883	0,226	0,870	1,136	0,829	5,473	0,803	8,229	0,786	9,655
5	98700,000	0,874	0,228	0,872	0,229	0,862	1,147	0,823	5,511	0,798	8,170	0,781	9,815
6	99738,000	0,921	0,217	0,918	0,283	0,908	1,034	0,867	5,354	0,843	7,782	0,830	8,894
SD	614,142	0,039	0,009	0,039	0,051	0,040	0,098	0,038	0,208	0,040	0,420	0,043	0,847
KV	0,616	4,234	4,160	4,221	17,961	4,395	9,483	4,411	3,887	4,707	5,394	5,201	9,517
No.	Skualena isolat ( ppm )	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	200240,000	0,942	0,318	0,936	0,637	0,916	2,553	0,876	6,709	0,768	18,036	0,858	32,941
2	200260,000	0,964	0,310	0,959	0,749	0,940	2,250	0,893	7,076	0,803	16,354	0,632	34,029
3	200180,000	0,935	0,320	0,928	0,749	0,912	2,251	0,867	6,774	0,773	16,613	0,619	33,081
4	199300,000	0,885	0,338	0,878	0,791	0,859	2,386	0,807	7,982	0,719	17,829	0,579	33,448
5	197400,000	0,873	0,343	0,867	0,801	0,851	2,408	0,807	7,348	0,716	17,606	0,583	32,679
X	199476,000	0,920	0,326	0,914	0,754	0,896	2,370	0,850	7,178	0,756	17,288	0,654	33,236
SD	1228,283	0,039	0,014	0,039	0,065	0,039	0,126	0,040	0,517	0,038	0,755	0,116	0,523
KV	0,616	4,238	4,310	4,313	8,732	4,319	5,328	4,747	7,202	4,955	4,368	17,75	1,574



Lanjutan

No.	Skualena	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	300360,000	0,938	0,741	0,919	2,442	0,893	5,000	0,774	17,572	0,461	50,800	0,153	83,636
2	300390,000	0,960	0,640	0,942	2,570	0,920	4,180	0,780	18,835	0,464	51,667	0,166	82,672
3	300120,000	0,932	0,640	0,911	2,567	0,894	4,180	0,769	17,312	0,462	50,162	0,154	83,351
4	298950,000	0,881	0,788	0,865	2,260	0,843	4,205	0,711	18,928	0,422	51,771	0,138	84,138
5	296100,000	0,869	0,799	0,855	2,174	0,851	4,702	0,703	19,228	0,427	50,863	0,140	83,834
X	299184,000	0,916	0,722	0,898	2,403	0,876	4,453	0,747	18,387	0,447	51,053	0,150	83,526
SD	1822,040	0,039	0,078	0,037	0,180	0,038	0,378	0,037	0,884	0,021	0,668	0,012	0,557
KV	0,609	4,267	10,755	4,121	7,491	4,294	8,490	4,976	4,807	4,657	1,309	7,626	0,670
IR	Skualena	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
IRP	isolat (ppm)	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	250300,000	0,941	0,423	0,925	1,805	0,908	3,404	0,803	14,484	0,610	34,899	0,263	71,872
2	250325,000	0,962	0,426	0,949	1,820	0,934	3,320	0,811	15,609	0,619	35,521	0,253	73,591
3	250225,000	0,934	0,426	0,918	1,818	0,902	3,323	0,798	14,194	0,612	33,981	0,257	72,216
4	249125,000	0,883	0,563	0,869	1,808	0,850	3,409	0,738	15,850	0,554	36,386	0,227	73,908
5	246750,000	0,870	0,571	0,859	1,716	0,843	3,326	0,731	16,074	0,555	36,134	0,225	74,015
X	249345,000	0,918	0,482	0,904	1,793	0,887	3,356	0,776	15,242	0,590	35,384	0,245	73,121
SD	1535,354	0,040	0,078	0,039	0,044	0,039	0,046	0,038	0,847	0,033	0,973	0,018	1,003
KV	0,616	4,306	16,156	4,253	4,429	4,429	1,365	4,951	5,557	5,522	2,751	7,233	1,372

## Lanjutan

No.	Skualena isolat (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	400480,000	0,925	2,116	0,894	5,098	0,846	10,000	0,467	50,266	0,102	89,114	0,053	94,332
2	400520,000	0,944	2,450	0,916	4,920	0,866	10,166	0,469	51,197	0,098	89,792	0,051	94,676
3	400360,000	0,915	2,450	0,889	4,920	0,836	10,397	0,461	50,430	0,091	90,183	0,043	95,351
4	398600,000	0,865	2,590	0,838	5,311	0,790	10,227	0,410	53,250	0,069	92,114	0,043	95,053
5	398600,000	0,855	2,397	0,829	5,149	0,784	10,092	0,423	51,435	0,071	91,830	0,046	94,683
6	399712,000	0,901	2,401	0,873	5,079	0,824	10,176	0,446	51,316	0,086	90,607	0,047	94,821
SD	1016,819	0,039	0,175	0,038	0,166	0,036	0,150	0,028	1,189	0,015	1,308	0,005	0,392
KV	0,254	4,311	7,268	4,326	3,259	4,351	1,471	6,161	2,317	17,773	1,443	9,755	0,414

## Lampiran 3

Hasil Pengamatan dan perhitungan Aktivitas Antriradikal bebas DPPH oleh Larutan  $\alpha$  - Tokoferol dalam etanol diamati dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  517

No.	DPPH (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	3.740. 10 <sup>3</sup>	0,825	-	0,823	-	0,822	-	0,821	-	0,820	-	0,820	-
2	3.700. 10 <sup>3</sup>	0,803	-	0,802	-	0,800	-	0,800	-	0,800	-	0,798	-
3	3.980. 10 <sup>3</sup>	0,749	-	0,748	-	0,747	-	0,747	-	0,746	-	0,743	-
4	3.960. 10 <sup>3</sup>	0,869	-	0,869	-	0,864	-	0,858	-	0,853	-	0,854	-
5	3.912. 10 <sup>3</sup>	0,909	-	0,898	-	0,894	-	0,888	-	0,883	-	0,873	-
SD	3.858. 10 <sup>3</sup>	0,831	-	0,828	-	0,825	-	0,823	-	0,820	-	0,818	-
KV	0,130	0,061	-	0,059	-	0,057	-	0,054	-	0,052	-	0,051	-
	3.357	7,387	-	7,063	-	6,907	-	6,590	-	6,373	-	6,221	-
No.	$\alpha$ - Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	5.350	0,720	12,727	0,718	12,758	0,718	12,652	0,715	12,911	0,710	13,415	0,707	13,781
2	5.300	0,700	12,827	0,698	12,968	0,695	13,125	0,694	13,250	0,694	13,375	0,691	13,408
3	5.200	0,635	15,220	0,632	15,508	0,630	15,663	0,627	16,064	0,625	16,220	0,624	16,016
4	5.775	0,718	17,376	0,711	18,182	0,702	18,750	0,695	18,998	0,690	19,109	0,680	18,935
5	5.350	0,747	17,822	0,735	18,152	0,734	17,897	0,732	17,568	0,742	15,968	0,736	15,693
X	5.335	0,704	15,194	0,699	15,514	0,696	15,617	0,693	15,758	0,692	15,617	0,688	15,567
SD	0,099	0,042	2,417	0,040	2,653	0,040	2,739	0,040	2,658	0,043	2,375	0,041	2,203
KV	1,863	5,975	15,904	5,675	17,102	5,713	17,541	5,760	16,868	5,180	15,205	6,011	14,152

## Lanjutan

No.	α-Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	10.700	0,603	26,909	0,597	27,461	0,595	27,616	0,585	28,745	0,580	29,268	0,579	29,390
2	10.600	0,588	26,775	0,586	26,933	0,586	26,750	0,586	26,750	0,585	26,875	0,585	26,692
3	10.400	0,507	32,310	0,506	32,353	0,505	32,396	0,505	32,396	0,503	32,574	0,503	32,302
4	10.950	0,569	34,522	0,561	35,443	0,558	35,417	0,550	35,897	0,545	36,108	0,540	36,095
5	10.700	0,635	30,143	0,624	30,512	0,623	30,313	0,622	29,955	0,620	29,785	0,616	29,439
6	10.670	0,580	30,132	0,575	30,540	0,573	30,498	0,570	30,749	0,567	30,922	0,565	30,784
7	0,199	0,048	3,379	0,045	3,529	0,045	3,542	0,044	3,530	0,044	3,537	0,044	3,571
8	1,863	8,203	11,214	7,762	11,556	7,780	11,614	7,757	11,481	7,834	11,437	7,753	11,600
No.	α-Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	16,050	0,513	37,818	0,512	37,789	0,511	37,835	0,509	38,002	0,505	38,415	0,504	38,537
2	15,900	0,496	38,232	0,494	38,404	0,493	38,375	0,493	38,375	0,493	38,375	0,492	38,346
3	15,600	0,446	40,454	0,444	40,642	0,442	40,830	0,442	40,830	0,441	40,885	0,440	40,781
4	16,425	0,490	43,613	0,489	43,982	0,484	43,982	0,477	44,406	0,470	44,900	0,460	45,562
5	16,050	0,549	39,944	0,539	39,978	0,533	40,380	0,525	40,878	0,519	41,223	0,518	40,664
X	16,005	0,499	39,944	0,496	40,159	0,493	40,280	0,489	40,498	0,486	40,760	0,483	40,778
SD	0,298	0,037	2,307	0,035	2,428	0,034	2,430	0,032	2,562	0,031	2,672	0,032	2,909
KV	1,863	7,498	5,775	7,034	6,046	6,888	6,033	6,516	6,516	6,330	6,555	6,651	7,132

Lanjutan

No.	α- Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	21,400	0,413	49,939	0,406	50,668	0,402	51,095	0,400	51,279	0,397	51,585	0,395	51,829
2	21,200	0,365	54,795	0,361	54,988	0,360	55,000	0,360	55,000	0,360	55,000	0,359	55,013
3	20,800	0,360	51,936	0,354	52,674	0,349	53,280	0,347	53,548	0,345	53,753	0,344	53,701
4	20,900	0,420	51,668	0,415	52,244	0,409	52,662	0,400	53,380	0,394	53,810	0,388	54,083
5	21,400	0,437	51,925	0,424	52,784	0,423	52,685	0,422	52,478	0,421	52,322	0,421	51,776
SD	21,140	0,399	52,053	0,392	52,672	0,389	52,944	0,386	53,137	0,383	53,294	0,381	53,280
SD	0,279	0,035	1,744	0,032	1,547	0,032	1,406	0,031	1,377	0,031	1,347	0,030	1,431
KV	1,321	8,644	3,350	8,221	2,938	8,304	2,655	8,078	2,592	7,968	2,527	7,971	2,686
No.	α- Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	26,750	0,291	64,727	0,280	65,978	0,272	66,910	0,268	67,327	0,263	67,927	0,262	68,049
2	26,500	0,279	65,255	0,276	65,586	0,272	66,000	0,270	66,250	0,268	66,500	0,267	66,541
3	26,000	0,254	66,088	0,246	67,112	0,242	67,604	0,238	68,139	0,234	68,633	0,234	68,506
4	26,375	0,268	69,160	0,262	69,850	0,256	70,370	0,253	70,692	0,250	70,692	0,249	70,533
5	26,750	0,348	61,716	0,340	62,138	0,336	62,416	0,330	63,194	0,325	63,194	0,322	63,116
X	26,475	0,288	65,389	0,281	66,133	0,276	66,660	0,300	67,389	0,268	67,389	0,267	67,349
SD	0,311	0,036	2,677	0,036	2,787	0,036	2,880	0,054	2,790	0,035	2,790	0,033	2,763
KV	1,176	12,575	4,093	12,707	4,314	13,066	4,320	17,809	4,140	12,864	4,140	12,520	4,103

## Lanjutan

No.	α- Tokoferol (ppm)	0 jam		1 jam		2 jam		3 jam		4 jam		5 jam	
		A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P	A	% P
1	32.100	0.216	73,818	0.187	77,278	0.179	78,224	0.174	78,806	0.168	79,512	0.166	79,756
2	31.800	0.186	76,837	0.181	77,431	0.178	77,750	0.178	77,750	0.178	77,750	0.178	77,694
3	31.200	0.182	75,701	0.180	75,936	0.177	76,305	0.174	76,707	0.171	77,078	0.168	77,389
4	31.850	0.168	80,667	0.160	81,588	0.156	81,944	0.154	82,051	0.152	82,181	0.150	82,249
5	32.000	0.251	72,387	0.240	73,274	0.234	73,826	0.230	74,099	0.228	74,179	0.225	74,227
6	31.810	0.201	75,882	0.190	77,101	0.185	77,610	0.182	77,883	0.179	78,090	0.177	78,263
SD	0.368	0.033	3,175	0.030	3,012	0.029	2,967	0.028	2,913	0.029	2,976	0.028	2,979
KV	1,157	16,532	4,184	15,799	3,906	15,755	3,822	15,618	3,740	16,047	3,811	16,031	3,806

Contoh perhitungan luas area dibawah kurva (AUC):

$$\text{Dari rata \% P / ppm, digunakan rumus: } AUC^0 = \frac{[P_n + P_{n-1}]}{2} [(t_n - t_{n-1})]$$

dimana t = waktu (jam); n = jam ke dan AUC = Area Under Curve

No.	% Aktivitas antiradikal (% P / ppm) α - tokoferol				
	0.0 jam	1.0 jam	2.0 jam	3.0 jam	4.0 jam
1.	2,849	2,907	2,928	2,954	2,932

$$AUC_{0-1}^0 = \frac{[2,849 + 0]}{2} [(0 - 0)] = 1,425; AUC_{1-2}^1 = \frac{[2,907 + 2,849]}{2} [(1 - 0)] = 2,878$$

## Lampiran 4

HASIL LIMA KALI PENGULANGAN AKTIVITAS ANTIPEROKSIDA LEMAK  $\alpha$  -  
 TOKOFEROL DALAM HOMOGENAT HEPAR TIKUS , DIAMATI DENGAN  
 SPEKTROFLUOROMETER PADA  $\lambda_{\text{EKS.}} = 539 \text{ nm}$  DAN  $\lambda_{\text{EM.}} = 549 \text{ nm}$

No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida
1	10,080	611,2	14,119	25,200	576,4	29,060
2	10,050	491,3	14,708	25,125	419,0	29,062
3	10,200	610,4	13,854	25,050	570,2	31,248
4	10,060	530,5	12,107	25,150	4,571	29,738
5	10,080	493,7	12,168	25,200	4,518	29,049
X	10,058		13,391	25,145		30,677
SD	0,025		1,186	0,062		2,951
KV	0,249		8,854	0,247		7,201
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida
1	50,400	522,0	52,422	75,600	478,4	71,144
2	50,250	358,6	50,660	75,375	271,5	74,242
3	50,100	527,9	49,550	75,150	480,1	70,232
4	50,300	372,7	50,012	75,450	286,9	70,622
5	50,400	398,2	50,645	75,600	351,3	70,185
X	50,290		50,656	75,435	349,7	71,285
SD	0,125		1,091	0,187		1,697
KV	0,249		2,153	0,248		2,693
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kontrol	Blanko I	Blanko II
1	100,800	448,5	84,111	285,9	411,2	53,02
2	100,500	214,9	89,572	496,4	176,4	127,2
3	100,200	453,7	81,655	288,5	411,3	57,38
4	100,600	214,5	88,014	684,1	164,6	267,8
5	100,800	303,6	88,759	836,0	275,7	587,8
X	100,580		88,422			
SD	0,249		3,391			
KV	0,248		3,923			

## Lampiran 5

HASIL LIMA KALI PENGULANGAN UJI AKTIVITAS ANTIPEROKSIDA LEMAK  
SKUALENA BAKU DALAM HOMOGENAT HEPAR TIKUS, DIAMATI DENGAN  
SPEKTROFLUOROMETER PADA  $\lambda_{\text{eks.}} = 539 \text{ nm}$  DAN  $\lambda_{\text{em.}} = 549 \text{ nm}$

No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas	% Anti-peroksida
1	10,030	422,8	5,542	25,075	399,1	12,839
2	10,050	463,1	4,909	25,125	437,1	12,079
3	10,010	437,5	5,118	25,025	410,1	13,349
4	10,030	700,0	4,834	25,075	666,3	10,906
5	10,040	666,9	4,550	25,100	649,3	12,638
X	10,032		4,951	25,080		12,362
SD	0,015		0,400	0,037		0,933
KV	0,150		8,081	0,148		7,543
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida
1	50,150	345,9	29,218	75,225	287,1	47,321
2	50,250	370,8	30,364	75,375	306,3	48,152
3	50,050	350,8	31,069	75,075	298,3	46,782
4	50,150	566,4	29,499	75,225	476,5	46,231
5	50,200	613,1	28,355	75,300	580,4	44,302
X	50,160		29,701	75,240		46,558
SD	0,074		1,048	0,111		1,447
KV	0,148		3,530	0,148		3,107
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kontrol	Blanko I	Blanko II
1	100,300	190,2	77,155	450,5	116,0	125,7
2	100,500	222,5	71,263	493,8	118,3	131,8
3	100,100	205,4	74,589	465,3	120,5	131,2
4	100,300	349,1	69,887	724,9	187,6	223,7
5	100,400	521,8	71,232	863,3	459,2	645,7
X	100,320		72,825			
SD	0,148		2,978			
KV	0,148		4,089			

Contoh perhitungan % aktivitas antiperoksida lemak

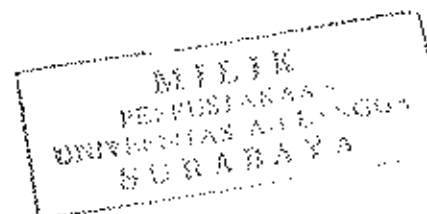
( E.Sed.Uji - E.Blanko I )

$$\% \text{ aktivitas} = [ 1 - ( \text{E. Kontrol} - \text{E.Blanko II} ) ] 100 \%$$

Kadar = 100,300 ; Intensitas warna ( E.sed.Uji ) = 190,2 ; E. Blanko I = 116,0

E. Kontrol = 450,5 ; E.Blanko II = 125,7       $( 190,2 - 116,0 )$

$$\% \text{ aktivitas antiperoksida lemak} = [ 1 - ( 450,5 - 125,7 ) ] 100 \% = 77,162$$





## Lampiran 6

LIMAKALI PENGULANGAN AKTIVITAS ANTIPEROKSIDA LEMAK SKUALENA ISOLAT  
DALAM HOMOGENAT HEPAR TIKUS , DIAMATI DENGAN SPEKTROFLUOROMETER  
PADA  $\lambda_{EKS.} = 539 \text{ nm}$  DAN  $\lambda_{EM.} = 549 \text{ nm}$

No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida
1	10,044	840,1	2,140	26,100	824,1	4,983
2	10,045	1015	2,100	26,125	998,8	5,085
3	10,370	995,0	1,856	25,925	975,7	4,918
4	10,240	914,0	1,730	25,600	901,1	4,280
5	10,390	971,5	2,042	25,975	953,5	5,157
X	10,378		1,974	26,945		4,996
SD	0,084		0,174	0,210		0,407
KV	0,810		8,831	0,810		8,210
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida
1	50,220	798,1	10,538	78,300	761,5	17,856
2	50,225	970,8	10,243	78,375	938,8	16,139
3	51,850	944,3	9,900	77,775	904,3	16,246
4	51,200	870,9	10,201	78,800	841,2	16,038
5	51,950	921,3	10,728	77,925	890,3	16,093
X	51,089		10,322	77,835		16,474
SD	0,842		0,320	0,187		0,776
KV	0,165		3,103	0,248		4,711
No.	Kadar (ppm)	Intensitas warna	% Anti-peroksida	Kontrol	Blanko I	Blanko II
1	104,400	722,6	25,635	817,0	350,7	316,9
2	104,500	890,5	25,037	999,0	483,6	456,2
3	103,700	867,1	22,148	994,9	376,4	364,6
4	102,400	812,5	21,678	963,2	414,0	454,4
5	103,900	844,6	24,001	994,9	376,4	364,6
X	103,780		23,700			
SD	0,841		1,741			
KV	0,810		7,345			

**Lampiran 7****Larutan Dapar Fosfat ( PBS )****Dulbeccos' Phosphate Buffer Solution**

	<b>g / l</b>
Na Cl .....	8.000
KCl .....	0,200
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	0,100
MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O .....	0,100
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O .....	1,150
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,200
<b>NaOH 1 N ad pH 7,40</b>	