

KEMAMPUAN PIGMEN KAROTEN DAN XANTOFIL MIKROALGA *Porphyridium cruentum* SEBAGAI ANTIOKSIDAN PADA DOMBA

The Ability of Pigments Carotene and Xanthophyll Porphyridium cruentum as Antioxidant on Sheep Red Blood Cells

Ni Wayan Sri Agustini

Puslit Bioteknologi LIPI, Jl. Raya Bogor Km 46, Cibinong, Bogor, Jawa Barat, 16911 - Indonesia

Telp. (021) 8754587, 87905152, Fax. (021) 8754588

E-mail : wayan_sa2002@yahoo.com

(Makalah diterima 10 Mei 2017 – Disetujui 30 Mei 2017)

ABSTRAK

Xantofil dan karotene merupakan golongan dari karotenoid yang berpotensi sebagai antioksidan dan telah dilaporkan karotenoid dapat disintesis oleh mikroalga *P. cruentum*. Penelitian ini bertujuan menguji potensi karoten dan xantofil *P. cruentum* sebagai antioksidan, dengan mengukur kadar *malondialdehyde* (MDA) dan *superoxide dismutase* (SOD) pada sel darah merah domba (SDMD) yang diberi stres oksidatif. Pengukuran MDA menggunakan metode *thiobarbituric acid reactive substance* (TBARS) yang didasarkan pada reaksi antara dua molekul TBA dengan satu molekul pada kondisi asam. Pengukuran aktivitas SOD dilakukan dengan metoda Adenochrom Assay yang didasarkan pada kemampuan SOD menghambat autooksidasi dari epinefrin pada kondisi basa. Konsentrasi karoten yang digunakan terdiri dari 0,6; 6; 60 µg/mL dan kontrol positif (vitamin E), sedangkan konsentrasi xantofil terdiri dari 0,8; 8; 80 µg/mL dan kontrol positif (vitamin C). Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kadar MDA pada sel darah merah domba yang diberi pigmen karoten yaitu $0,78 \pm 0,02$ nmol/ml (0,6 µg/ml); $0,34 \pm 0,04$ nmol/ml (6µg/ml); $0,15 \pm 0,04$ (60 µg/ml), dan yang diberi pigmen xantofil yaitu $0,64 \pm 0,04$ nmol/ml (0,8 µg/ml); $0,6 \pm 0,06$ nmol/ml (8 µg/ml); dan $0,52 \pm 0,04$ nmol/ml (80 µg/ml). Aktivitas SOD pada sel darah merah domba yang diberi pigmen karoten yaitu $31,53 \pm 1,98$ unit/ml (0,6 µg/ml); $39,16 \pm 1,2$ (6 µg/ml); $48,1 \pm 0,46$ unit/ml (60 µg/ml), dan yang diberi pigmen xantofil $29,17 \pm 1,2$ (0,8 µg/ml); $37,32 \pm 0,79$ unit/ml (8 µg/ml); dan $42,58 \pm 1,2$ unit/ml (80 µg/ml). Uji statistik menunjukkan pemberian pigmen karoten maupun xantofil terhadap sel darah merah domba yang mengalami stres oksidatif dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD. Hal ini membuktikan pigmen karoten dan xantofil mikroalga *P. cruentum* mempunyai kemampuan sebagai antioksidan.

Kata kunci: domba, antioksidan, karotenoid, malondialdehyde, *P. cruentum*

ABSTRACT

Xanthophyll and carotene is a carotenoid group that has potential as an antioxidant and has been reported carotenoids can be synthesized by microalgae P. cruentum. This study aimed to test the potential carotene and xantofil of P. cruentum as an antioxidant, by measuring of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) on sheep red blood cells by oxidative stress. Measurement of MDA using the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) which is based on the reaction between two molecules of TBA with one molecule under acidic conditions. SOD activity measurements with Adenochrom Assay method that is based on the ability of SOD inhibits autooxidation of epinephrine under alkaline conditions. Concentration of carotene used is 0.6; 6; 60 mg/mL and a positive control (vitamin E), while the concentration of xantophyll was 0.8; 8; 80 mg/mL and a positive control (vitamin C). The results showed that MDA levels in sheep red blood cells given carotene pigment were 0.78 ± 0.02 nmol/ml (0.6 µg/mL); 0.34 ± 0.04 nmol/mL (6 µg/mL); 0.15 ± 0.04 (60 µg/mL), and those given xantophyll pigment were 0.64 ± 0.04 nmol/mL (0.8 µg/ml); 0.6 ± 0.06 nmol/mL (8 µg/mL); 0.52 ± 0.04 nmol/mL (80 µg/mL). While the activity of SOD on sheep red blood cells given carotene pigment are 31.53 ± 1.98 unit/mL (0.6 µg/mL); 39.16 ± 1.2 (6 µg/mL); 48.1 ± 0.46 unit/mL (60 µg/mL) and given xantophyll pigment of 29.17 ± 1.2 unit/mL (0.8 µg/ml); 37.32 ± 0.79 unit/mL (8 µg/mL); 42.58 ± 1.2 unit/mL (80 µg/mL). The result of statistical test using SPSS 16 concluded that use of carotene and xantophyllin sheep red blood cell that were given oxidative stress can decrease MDA level and increase the activity of SOD. This proves that carotene and xantophyll pigments of P. cruentum have the ability as antioxidant.

Key words: sheep, antioxidant, carotenoid, malondialdehyde, *P. cruentum*

PENDAHULUAN

Makanan yang mengandung minyak dan lemak dapat membentuk radikal bebas dalam tubuh dan berpotensi sebagai penyebab penyakit degeneratif seperti kanker, katarak, dan arterosklerosis (Lestario *et al.*, 2008). Radikal bebas dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh (Winarsih, 2007), namun tidak memiliki sistem pertahanan antioksidatif yang dapat menangkai paparan radikal yang berlebih, sehingga tubuh memerlukan antioksidan tambahan (Pham-Huy *et al.*, 2008; Sunarni *et al.*, 2007).

Antioksidan dapat diperoleh dengan cara mengisolasi dari alam dan cara sintesis. Dewasa ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena bersifat racun. Hasil penelitian Simiati (2012) menunjukkan antioksidan sintetik seperti *butylated hidroxy toluena* (BHT) dapat meracuni hewan percobaan dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu perlu ditelusuri sumber antioksidan alami seperti karotenoid (Baskar *et al.*, 2007; Suyatna, 1995).

Karotenoid adalah pigmen organik yang terdapat pada kloroplas dan kromoplas tumbuhan dan kelompok organisme lainnya seperti mikroalga (Hirschberg *et al.*, 1997) dan terbentuk dari delapan molekul isoprena sehingga mempunyai 40 atom karbon. Secara umum karotenoid dikelompokkan ke dalam karoten (karotenoid murni hidrokarbon, tidak memiliki atom oksigen) dan xantofil (karotenoid pembawa atom oksigen) (Kiokias *et al.*, 2016). Menurut del Campo *et al.* (2007), mikroalga merupakan salah satu sumber alami untuk berbagai senyawa penting, termasuk karotenoid. Salah satu mikroalga yang dapat menyintesis karotenoid adalah *Porphyridium cruentum*. Fuentes *et al.* (2000) melaporkan mikroalga *P. cruentum* mengandung karotenoid (β -karoten dan astaxantin) sekitar 102 mg/100 g bobot kering biomassa.

Senyawa antioksidan seperti karotenoid memerlukan beberapa tahap pengujian untuk mengetahui keamanan senyawa sebelum digunakan. Menurut Sayuti dan Yenrma (2015), pengujian antioksidan suatu senyawa dilakukan secara bertahap sebagai berikut: uji *in vitro* menggunakan reaksi kimia (misal DPPH, ABTS, dan lain-lain), uji *in vitro* menggunakan materi biologis (misal kadar *Malondialdehyde* dan aktivitas *superoxide dismutase* pada darah), uji *in vivo* pada hewan percobaan, dan uji *in vivo* pada manusia.

Pengujian antioksidan karotenoid dari *P. cruentum* telah dilakukan Agustini dan Kusmiati (2016) secara *in vitro* menggunakan bahan kimia. Hasil penelitian menunjukkan karotenoid dari *P. cruentum* memiliki aktivitas antioksidan yang kuat meredam radikal bebas (DPPH) dengan nilai IC₅₀ sebesar 66, 05 μ g/mL. Berdasarkan pengujian tersebut dilakukan penelitian lanjutan menggunakan material biologis seperti darah. Darah merupakan salah satu material biologis yang dapat digunakan pada uji *in vitro*, mudah diperoleh,

dan dapat menggambarkan proses berbagai penyakit (Perace, 2000). Di samping itu, *malondialdehyde* (MDA) yang merupakan hasil peroksidasi lipid dan *superoxide dismutase* yang merupakan antioksidan enzimatis dapat ditemukan pada darah (Jenero, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan antioksidan pigmen karoten dan xantofil yang berasal dari mikroalga *P. cruentum* pada materi biologis secara *in vitro*, berdasarkan aktivitas *superoxide dismutase* (SOD) dan kadar *malondialdehyde* (MDA) pada sel darah merah domba yang mengalami stres oksidatif.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikroalga Air Tawar, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI, Cibinong-Bogor, pada Agustus sampai dengan Desember 2016. Bahan uji yang digunakan adalah (1) mikroalga *P. cruentum* yang merupakan koleksi Laboratorium Mikroalga Air Tawar Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong, Bogor, dan (2) darah domba segar dari kandang percobaan Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk kultivasi *P. cruentum* adalah medium Jhonson (Becker, 1994), yaitu unsur makronutrisi yang terdiri atas MgSO₄ 0,5 g/L; MgCl₂ 1,5 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L; KNO₃ 0,5 g/L; KH₂PO₄ 0,035 g/L; NaHCO₃ 0,045 g/L; Mikronutrien 1 mL/L; Fe-EDTA 1 mL/L; NaCl 27 g/L. Unsur mikronutrisi (1 mL/L) terdiri atas ZnSO₄.6H₂O 0,84 g/L; H₃BO₃ 6 g/L; CuSO₄.5H₂O 0,6 g/L; MnCl₂.6H₂O 4 g/L; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O 4 g/L. Larutan Fe-EDTA yang digunakan adalah 0,859 g FeCl₃ dan 2,67 g EDTA yang dilarutkan dalam 100 mL akuades. Larutan mikronutrisi dan Fe-EDTA diperlukan 1 mL/L.

Sementara itu, bahan kimia untuk analisis MDA dan SOD meliputi asam trikloroasetat (TCA) (sigma), asam tiobarbiturat (TBA) (Sigma), natrium hidroksida, tetra etoksi propan (TEP) (Sigma), d-1 epinefrin (sigma), asam klorida (Merck), natrium karbonat, Na-EDTA (Merck), vitamin C, vitamin E, kalium hidroksida, natrium klorida, asam sulfat (Merck), Etanol 96%, kloroform, *n*-heksana, diklorometan, dan akuades.

Alat yang digunakan adalah spektrofotometer UV-Vis (Hitachi U-3900H), sentrifugator (Himac CT6EL), penangas air, aerator, lampu neon, timbangan analitik, timbangan setara, *stopwatch*, mikropipet, oven, lemari pendingin, wadah kultur, gelas ukur, tabung sentrifuse kecil dan besar, inkubator, dan *vacutainer blood tube*.

Kultivasi *Porphyridium cruentum*

Mikroalga *P. cruentum* dikultivasi dalam medium Jhonson pada botol berukuran 2 liter, di bawah penyinaran

lampu neon TL 40 watt dengan intensitas cahaya + 2.500 Lux, dan dilakukan aerasi secara terus-menerus dengan aerator pada kecepatan 1 mL/menit. Kepadatan sel kultur *P. cruentum* diukur dengan metode turbidimetri menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 680 nm.

Ekstraksi Karotenoid (Li et al., 2002)

Biomassa basah dengan dosis 1 g (fase logaritmik akhir) *P. cruentum* diekstraksi dengan menambahkan 4 mL larutan KOH 10 M. Kemudian dipanaskan pada suhu 50°C selama 15 menit. Setelah dingin, ditambahkan 2,6 mL diklorometan dan disentrifusi selama 10 menit pada kecepatan 3.500 rpm. Fraksi karotenoid yang berwarna kuning dikumpulkan, dilakukan berulang hingga fraksi berwarna kuning menjadi kuning pucat. Setelah itu dilakukan pengeringan di atas penangas pada suhu 40°C, hingga didapat ekstrak kental. Ekstrak kental karotenoid dilarutkan dalam pelarut *n*-heksana-etanol 96% (1:1) hingga didapat dua fraksi. Fraksi *n*-heksana sebagai golongan karoten, sedangkan fraksi etanol sebagai golongan xantofil.

Persiapan Sel Darah Merah Domba

Darah merah domba dengan dosis 10 mL disentrifusi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit pada suhu 5°C. Kemudian lapisan atas (plasma) dipisahkan dari endapan sel darah merah domba (SDMD). Lapisan plasma digunakan untuk pengujian *malondialdehyde* (MDA). Endapan SDMD disuspensikan dengan menambahkan *phosphate buffer saline* (PBS) sebanyak lima kali volume endapan sel darah merah domba, kemudian disentrifus pada kecepatan 3.000 rpm selama 5 menit. Larutan *phosphate buffer saline* (PBS) dibuang, dilakukan pengulangan tiga kali. Endapan SDMD siap digunakan untuk analisis aktivitas *superoxide dismutase* (SOD).

Pengukuran Malondialdehyde

Pembuatan Kurva Baku Tetra Etoksi Propan (TEP)

Larutan baku tetra etoksi propan (TEP) yang digunakan adalah 10,0; 20,0; 40,0; 60,0; 80,0; 100,0 dan 120,0 µL (1:80.000), kemudian ditambahkan akuades hingga masing-masing mencapai volume 250 µL. Setelah itu ditambahkan 1,25 mL asam trikloroasetat (TCA) 20% dan 0,5 mL asam tiobarbiturat (TBA) 0,67% dan dikocok hingga homogen. Untuk blangko 250 µL, 1,25 ml larutan TCA 20% dan 0,5 ml TBA 0,67% dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen. Larutan standar blangko dibuat triplo. Semua sampel dipanaskan selama 30 menit pada suhu 100°C dan segera didinginkan

dengan air mengalir. Setiap campuran diukur serapannya pada panjang gelombang 532 nm. Masing-masing kadar larutan baku TEP dan serapannya diplot sebagai kurva baku TEP untuk menentukan kadar MDA. Kurva baku TEP ditetapkan berdasarkan nilai serapan yang diperoleh dari persamaan regresi linier TEP.

Pengujian Malondialdehyde (MDA)

(1) Fraksi n-heksana/karoten

Kelompok I: kontrol normal terdiri atas 0,5 mL plasma + 1 ml larutan KRP

Kelompok II: kontrol negatif terdiri atas 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kontrol III: kontrol positif terdiri atas 0,5 mL plasma + 0,5 mL vitamin E 0,04 IU + 0,5 mL larutan t-BHP)

Kelompok IV: (karoten dosis 0,6 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan karoten dosis 0,6 µg/mL + 0,5 ml larutan t-BHP.

Kelompok V: (karoten dosis 6 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan karoten dosis 6 µg/mL + 0,5 ml t-BHP.

Kelompok VI: (karoten dosis 60 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan karoten dosis 60 µg/mL + 0,5 ml larutan t-BHP.

(2) Fraksi etanol/xantofil

Kelompok I :kontrol normal terdiri dari 0,5 mL plasma + 1 ml larutan KRP

Kelompok II :kontrol negatif terdiri dari : 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kontrol III :kontrol positif terdiri dari : 0,5 mL plasma + 0,5 mL vitamin C 10 ppm+ 0,5 mL larutan t-BHP)

Kelompok IV (xantofil dosis 0,8 µg/mL) terdiri dari : 0,5 mL plasma+ 0,5 mL larutan xantofil dosis 0,8 µg/mL + 0,5 ml larutan t-BHP.

Kelompok V (xantofil dosis 8 µg/mL) terdiri dari 0,5 mL plasma+ 0,5 mL larutan xantofil dosis 8 µg/mL + 0,5 ml t-BHP.

Kelompok VI (xantofil dosis 80 µg/mL) terdiri dari 0,5 mL plasma + 0,5 mL larutan xantofil dosis 80 µg/mL + 0,5 ml larutan t-BHP.

Pengukuran Kadar Sampel Malondialdehyde (MDA)

Semua kelompok uji diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 15 menit. Setelah itu disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 3.000 rpm. Kemudian diambil 0,25 mL supernatan dan ditambahkan 1,25 mL TCA 20% dan 0,5 mL TBA 0,67%, lalu dihomogenisasi. Campuran larutan dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit, kemudian segera didinginkan pada air mengalir. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombang 532 nm.

Kadar MDA dihitung menggunakan persamaan garis regresi kurva baku TEP. Pengujian kadar MDA sampel dilakukan secara triplo.

Pengujian *Superoxide Dismutase* (SOD)

(1) Fraksi n-heksana/karoten

Kelompok I: kontrol normal terdiri atas 0,5 mL SDMD 10 % + 1 mL larutan KRP.

Kelompok II: kontrol negatif terdiri atas 0,5 mL SDMD 10 % + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kontrol III: kontrol positif terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL vitamin E 0,04 IU + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kelompok IV: (karoten dosis 0,6 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan karoten dosis 0,6 µg/mL + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kelompok V: (karoten dosis 6 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan karoten dosis 6 µg/mL + 0,5 ml t-BHP.

Kelompok VI: (karoten dosis 60 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan karoten dosis 60 µg/mL + 0,5 mL larutan t-BHP.

(2) Fraksi etanol/xantofil

Kelompok I: kontrol normal terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 1 ml larutan KRP.

Kelompok II: kontrol negatif terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kontrol III: kontrol positif terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL vitamin C 10 ppm+ 0,5 mL larutan t-BHP).

Kelompok IV: (xantofil dosis 0,8 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan xantofil dosis 0,8 µg/mL + 0,5 mL larutan t-BHP.

Kelompok V: (xantofil dosis 8 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan xantofil dosis 8 µg/mL + 0,5 mL t-BHP.

Kelompok VI: (xantofil dosis 80 µg/mL) terdiri atas 0,5 mL SDMD 10% + 0,5 mL larutan xantofil dosis 80 µg/mL + 0,5 mL larutan t-BHP.

Pengukuran *Superoxide Dismutase*

Semua kelompok uji diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 15 menit, kemudian disentrifuse pada putaran 3.000 rpm selama 5 menit. Endapan yang diperoleh dicuci dengan larutan NaCl 0,9% dan disentrifusi pada putaran 3.000 rpm selama 5 menit, dilakukan tiga kali. Setelah itu, ditambahkan 1,0 mL hemolisat dengan 1 mL campuran kloroform etanol 96% (3:5), dan disentrifusi pada putaran 2.500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh disimpan dalam lemari pendingin.

Untuk tabung sampel dimasukkan 50 µL supernatan dicampur 2.900 µL dapar karbonat (pH 10,2) dan 50

µL epinefrin 0,02 M. Pencampuran dilakukan langsung dalam kuvet. Absorban larutan diukur setelah menit ke-0, 1, 2, 3, 4, dan 5 pada panjang gelombang 480 nm dengan suhu 30°C. Tabung blanko terdiri atas campuran 2.900 µL dapar karbonat (pH 10,2), 50 µL akuades, 50 µL epinefrin 0,02 M, pencampuran dilakukan dalam kuvet, absorban larutan diukur pada menit ke-0, 1, 2, 3, 4 dan 5.

Perhitungan SOD

Aktivitas SOD dapat dihitung dengan mencari persentase hambatan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Hambatan} = \frac{\text{Absorban blanko} - \text{Absorban sampel}}{\text{Absorban blanko}} \times 100 \%$$

Setelah persentase hambatan didapat, maka aktivitas SOD dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Aktivitas SOD} = \frac{\% \text{ hambatan}}{50\%} \times F_p = \frac{b \text{ unit}}{1 \text{ mL}} = \text{unit/mL}$$

Analisis Data

Data dianalisis terlebih dahulu dengan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, yaitu uji beda nyata antara data normalitas dengan data normal baku. Jika terdapat signifikansi di bawah 0,05 berarti data yang akan diuji mempunyai perbedaan yang nyata dengan data normal atau data tidak normal. Bila signifikansi di atas 0,05 berarti tidak terdapat perbedaan yang nyata antara data yang akan diuji dengan data normal baku. Setelah data dinyatakan normal, langkah selanjutnya adalah uji homogenitas. Dalam hal ini digunakan uji homogenitas varians. Selanjutnya, bila nilai signifikansi < 0,05 maka pengujian dilanjutkan dengan uji perbandingan ganda (*Tukey*) menggunakan SPSS 16.

Analisis kadar MDA (Malondialdehyde) dalam sel darah merah domba ditentukan dengan persamaan regresi linier ($Y = a + bx$) dari kurva baku standar TEP.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kultivasi dan Pemanenan *Porphyridium cruentum*

Mikroalga *P. cruentum* dikultivasi pada medium Jhonson. Media ini memiliki makronutrisi dan mikronutrisi yang baik untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroalga *P. cruentum*. Pengukuran kultur *P. cruentum* dilakukan pada setiap kepadatan sel 1 x 24 jam menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 680 nm.

Berdasarkan kurva pertumbuhan *P. cruentum* tidak terlihat fase lag (adaptasi). Hal ini disebabkan karena stok kultur berada pada fase logaritmik, sehingga pada

saat dipindahkan pada kultur yang baru tidak terlihat fase adaptasi (Gambar 1). Pemanenan kultur dilakukan saat sel yang mengalami fase stasioner, karena senyawa yang akan diisolasi adalah karotenoid yang termasuk golongan senyawa metabolit sekunder. Hal ini sesuai dengan pendapat Kiokias *et al.* (2016) bahwa karotenoid adalah metabolit sekunder dari lemak yang dapat diproduksi oleh tumbuhan dan mikroorganisme. Oleh karena itu, untuk memperoleh karotenoid yang optimal dilakukan pemanenan mikroalga pada saat sel mencapai maksimum, yaitu pada fase stasioner.

Mikroalga dapat dipanen dengan beberapa cara seperti filtrasi, sentrifugasi, dan flokulasi. Dalam penelitian ini, pemanenan *P. cruentum* dilakukan dengan cara sentrifugasi, karena sel *P. cruentum* berukuran kecil (4-9 μM), dan *P. cruentum* konsisten mengeluarkan *mucilago* sehingga sel terikat satu sama lain (Lee, 2008). Cara disentrifuse adalah paling efektif untuk mikrolaga *P. cruentum*.

Ekstraksi Karotenoid

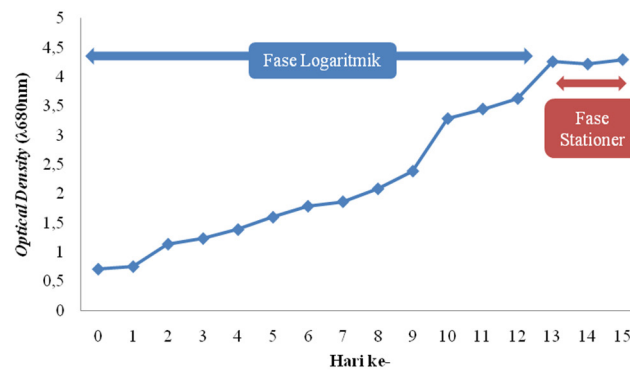
Biomassa yang digunakan untuk ekstraksi karotenoid adalah biomassa basah dengan kadar susut air $\pm 79,45\%$. Penggunaan biomassa basah bertujuan untuk menghindari

kerusakan pigmen karotenoid akibat pemanasan yang tinggi atau terpapar sinar matahari, karena karotenoid mudah teroksidasi bila terkena panas atau cahaya yang tinggi.

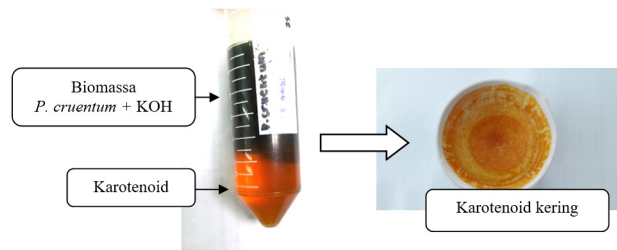
Proses saponifikasi pada ekstraksi bertujuan untuk memutus ikatan ester dan membuat karotenoid ke dalam bentuk bebas. Menurut Hirschberg *et al.* (1997), karotenoid berada pada kloroplas yang terikat pada lemak, sehingga diperlukan pemutusan ikatan ester antara lemak dan karotenoid dan membebaskan karotenoid.

Pelarut diklorometan mampu melarutkan karotenoid, berdasarkan kelarutan yang bersifat non-polar. Penambahan diklorometan yang berulang bertujuan agar karotenoid dapat terekstraksi optimal yang ditandai oleh perubahan warna kuning menjadi memudar. Setelah penambahan KOH dan diklorometan, dilakukan sentrifugasi sehingga didapat dua lapisan, yaitu biomassa *P. cruentum* dengan KOH dan lapisan karotenoid (Gambar 2). Lapisan karotenoid selanjutnya dikeringkan pada penangas.

Data pada Tabel 1 menunjukkan rendemen karotenoid total dari 1 g biomassa basah *P. cruentum* adalah 1,08%. Nilai rendemen tersebut menunjukkan dari 100 g biomassa basah *P. cruentum* dihasilkan 1,08 g karotenoid.



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *P. cruentum*



Gambar 2. Ekstraksi karotenoid dengan diklorometan dari *P. cruentum*

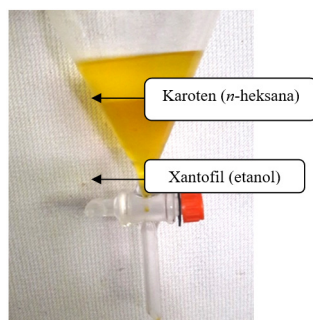
Tabel 1. Bobot karotenoid dari 1 g biomassa basah *P. cruentum*

No.	Bobot biomassa (g)	Bobot kering karotenoid (g)	Rendemen (%)
1	1,0028	0,0109	1,09
	1,0021	0,0107	1,07
Rata-rata \pm Sd	1,0025 \pm 0,0005	0,0108 \pm 0,0001	1,08 \pm 0,0141

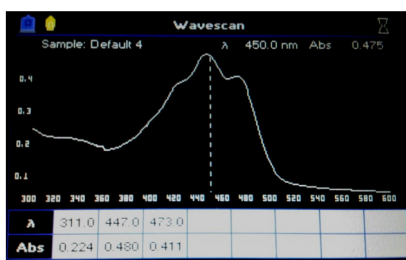
Karoten tersusun atas atom C dan H, yang larut dalam pelarut nonpolar seperti *n*-heksana. Pada xantofil, selain unsur C dan H terdapat atom O. yang memiliki nilai keelektronegatif tinggi, sehingga dapat menarik atom lain dan bersifat lebih polar. Kiokias *et al.* (2016) menyatakan xantofil memiliki gugus polar pada ujung strukturnya. Menurut Harbone (1986), senyawa xantofil akan larut lebih baik dalam metanol atau etanol. Karoten yang merupakan karotenoid hidrokarbon akan larut lebih baik dalam pelarut *non*-polar, seperti benzene dan *n*-heksana. Pemisahan karoten dan xantofil dilakukan melalui ekstraksi cair-cair bertingkat untuk pelarut etanol, karena xantofil juga memiliki gugus hidrokarbon panjang yang bersifat *non*-polar yang dapat larut dalam *n*-heksana.

Pada Gambar 3 terlihat etanol berada di bagian bawah, sedangkan *n*-heksana di bagian atas. Hal ini disebabkan karena massa etanol 0,789 g/mL lebih besar dibandingkan dengan massa *n*-heksana yang hanya 0,655 g/mL. Selama ekstraksi cair-cair diusahakan karotenoid terhindar dari paparan cahaya, karena karotenoid relatif tidak stabil dengan adanya cahaya (Zakynthinos dan Varzakas, 2016). Setelah xantofil dan karoten dipisah maka jumlah karoten lebih banyak daripada xantofil (Tabel 2).

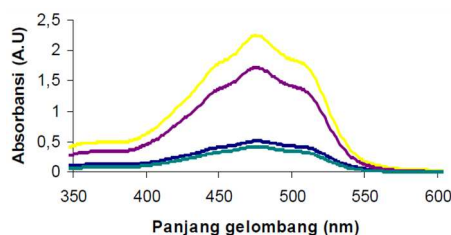
Spektrum spektrofotometri UV-Vis karotenoid dari mikroalga *P. cruentum* memiliki puncak utama dengan dua puncak lebih rendah pada kedua sisinya (Gambar 4 dan 5). Hal serupa juga ditunjukkan oleh hasil penelitian



Gambar 3. Ekstraksi cair-cair karotenoid dari *P. cruentum*



Gambar 4. Spektrum karotenoid *P. cruentum*



Gambar 5. Spektrum karotenoid

Tabel 2. Bobot kering fraksi *n*-heksana dan etanol setiap 0,01 g karotenoid total *P. cruentum*

Nama fraksi	Ulangan	Bobot kering (g)	Rata-rata ± sd (g)	Kadar (%)
<i>n</i> -Heksana	1	0,0076	0,006 ± 0,0009	60
	2	0,0073		
	3	0,0058		
Etanol	1	0,0047	0,004 ± 0,0004	40
	2	0,0047		
	3	0,0054		

Parinussa dan Rondonuwu (2009). Hasil penelitian menunjukkan ekstraksi yang dilakukan menggunakan pelarut diklorometan adalah ekstrak karotenoid.

Analisis Kadar Malondialdehyde

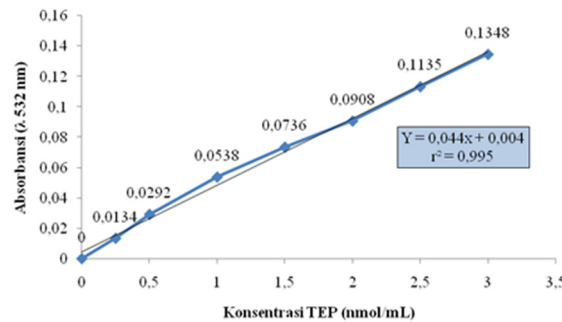
(1) Kurva baku tetra etoksi propan

Sebelum menetapkan kadar MDA, terlebih dahulu dibuat kurva kalibrasi TEP yang akan digunakan sebagai standar. Berdasarkan nilai serapan yang diperoleh maka didapatkan persamaan regresi linier TEP: $Y = 0,00457 + 0,04396 x$; dengan nilai koefisien relasi $r^2 = 0,995$ (Gambar 6). Nilai r^2 yang mendekati nilai 1 berarti terdapat hubungan antara konsentrasi larutan TEP dengan serapan yang dihasilkan.

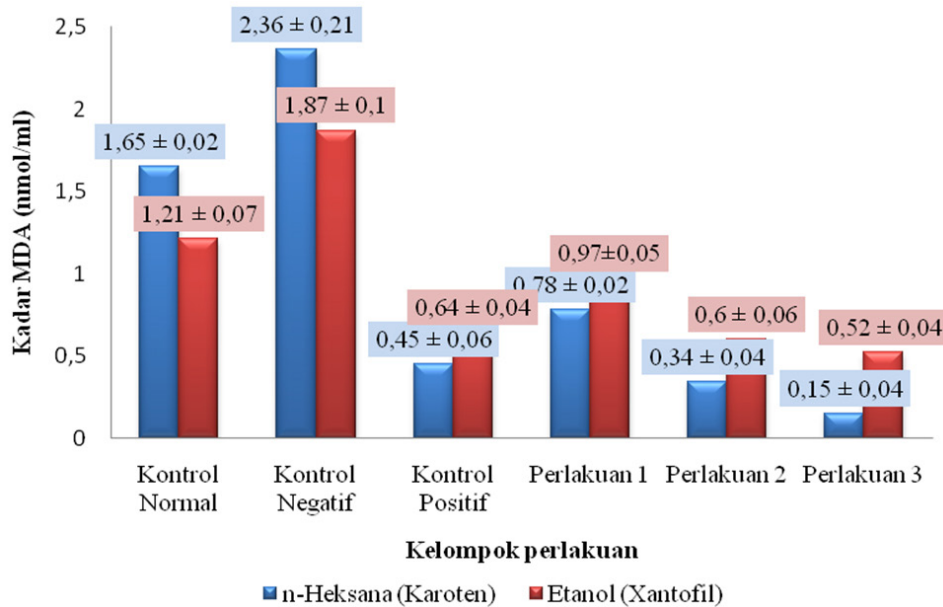
(2) Kadar sampel malondialdehyde

Konsentrasi *t*-BHP yang digunakan pada penelitian ini adalah 4 mM, sedangkan pada penelitian Nisma *et al.* (2010) 2 mM. Penggunaan konsentrasi yang lebih tinggi diharapkan mampu menunjukkan kadar MDA yang lebih jelas dan berbeda pada setiap perlakuan.

Kontrol normal digunakan untuk mengukur kandungan *malondialdehyde* dalam darah tanpa terpapar radikal bebas maupun antioksidan. Nilai yang dihasilkan menunjukkan hasil yang berbeda antara kontrol normal pada fraksi etanol dengan fraksi *n*-heksana. Kontrol normal fraksi *n*-heksana cenderung lebih besar dibandingkan dengan kontrol normal fraksi etanol. Nilai tersebut berturut-turut 1,65 nmol dan 1,21 nmol/mL (Gambar 7). Ditinjau dari segi pelarut yang digunakan sebagai kontrol, pelarut



Gambar 6. Hubungan regresi linear konsentrasi tetraetoksipropan dengan nilai absorbans



Keterangan:

Kontrol normal : Plasma + pelarut (n-heksana/akuades) + KRP

Kontrol negatif : Plasma + pelarut (n-heksana/akuades) + *t*-BHP

Kontrol positif : Plasma + vitamin E/ Vitamin C + *t*-BHP

Perlakuan 1 : Plasma + karoten (0,6 µg/mL)/xantofil (0,8 µg/mL) + *t*-BHP

Perlakuan 2 : Plasma + karoten (6 µg/mL)/xantofil (8 µg/mL) + *t*-BHP

Perlakuan 3 : Plasma + karoten (60 µg/mL)/xantofil (80 µg/mL) + *t*-BHP

Gambar 7. Kadar *malondialdehyde* ekstrak n-heksana/karoten dan etanol/xantofil *P. cruentum*

n-heksana memberikan efek oksidatif pada plasma yang dipakai dibandingkan dengan pelarut akuades.

Penelitian Indah (2008) mendapatkan kontrol normal dengan kadar MDA 1,798 nmol/mL, relatif tidak berbeda dengan hasil penelitian ini, karena pelarut yang digunakan sama yaitu *n*-heksana. Nilai MDA yang dihasilkan fraksi *n*-heksana pada kontrol normal memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan lainnya. Artinya, pada fraksi heksana, nilai MDA kontrol positif dan MDA perlakuan lain memiliki nilai berbeda, sebagaimana ditunjukkan oleh data uji *Tukey*. Kontrol normal fraksi etanol juga memiliki perbedaan yang nyata dengan perlakuan lainnya.

Terjadi peningkatan kadar MDA yang cukup tinggi, yang dapat merusak lipid dan membran yang menghasilkan *malondialdehyde* yang tinggi pula. Kadar *malondialdehyde* kontrol negatif fraksi etanol lebih kecil dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, namun tetap lebih tinggi di antara perlakuan dan kontrol lain, berturut turut 2,36 nmol dan 1,87 nmol/mL. Pada kontrol negatif, fraksi *n*-heksana dan etanol memiliki nilai yang berbeda nyata dibandingkan dengan perlakuan lainnya, sebagaimana ditunjukkan oleh uji *Tukey*.

Pada penelitian ini, kontrol positif menggunakan dua bahan yang berbeda, yaitu vitamin C dan vitamin E. Penggunaan kontrol positif didasari oleh kelarutan ekstrak yang berbeda, ekstrak *n*-heksana, dan vitamin E yang bersifat nonpolar, sedangkan vitamin C dan ekstrak etanol bersifat polar.

Malondialdehyde merupakan produk hasil kerusakan lipid dan membran akibat radikal bebas (Jenero, 2001). Ekstrak etanol yang dihasilkan tidak dilarutkan dalam etanol, melainkan dalam akuades, karena pada pengujian, membran fosfolipid pada plasma rusak oleh etanol (Yunus, 2001), dan *t*-BHP tidak lagi dapat mengoksidasi membran atau lipid, sehingga MDA tidak dapat terbentuk dan tidak dapat diukur.

Fraksi *n*-heksana memiliki nilai yang berbeda nyata antara kontrol normal, kontrol negatif, perlakuan I (0,6 µg/mL), dan perlakuan III (60 µg/mL), namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan II (6 µg/mL). Pada fraksi etanol, nilai pada kontrol positif berbeda nyata dengan kontrol normal, kontrol negatif, perlakuan I (0,8 µg/mL), dan perlakuan III (80 µg/mL), sedangkan dengan perlakuan II (8 µg/mL) tidak berbeda nyata.

Hasil penelitian menunjukkan kadar MDA fraksi *n*-heksana pada perlakuan I (0,6 µg/mL), perlakuan II (6 µg/mL), dan perlakuan III (60 µg/mL) berturut-turut 0,78 nmol, 0,34 nmol, dan 0,15 nmol/mL. Berdasarkan pengujian statistik menggunakan SPSS 14 (uji *Tukey*),

fraksi *n*-heksana pada perlakuan II memiliki nilai yang berbeda nyata dengan perlakuan lain, serta kontrol negatif dan normal, sedangkan dengan kontrol positif tidak berbeda nyata. Hal ini menunjukkan daya hambat perlakuan II dengan konsentrasi 6 µg/mL setara dengan daya hambat kontrol positif. Perlakuan I dan III dengan dosis masing-masing 0,6 µg dan 60 µg/mL memiliki nilai yang berbeda nyata dengan seluruh perlakuan dan kontrol (normal, negatif, positif).

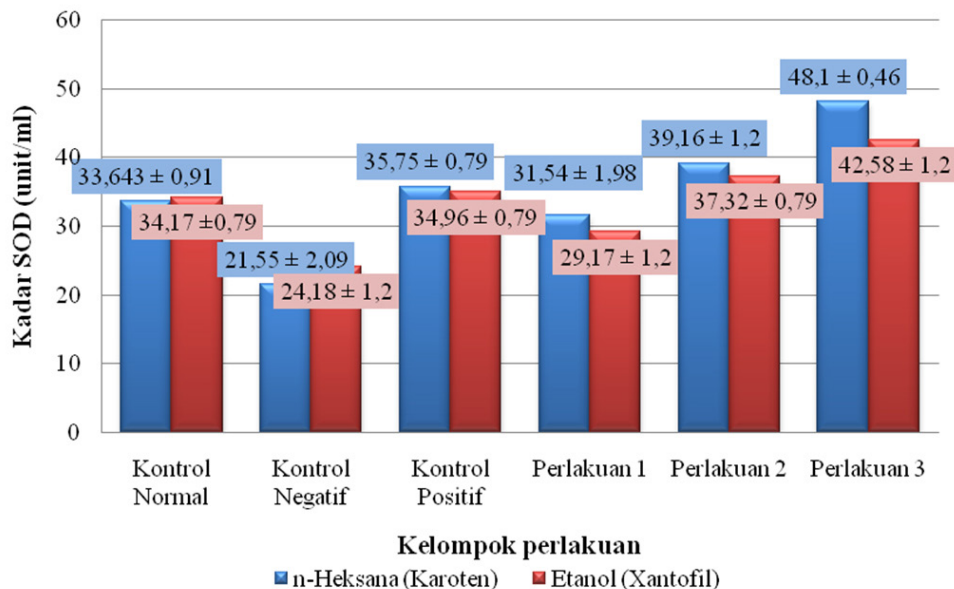
Kadar MDA fraksi etanol pada perlakuan I (0,8 µg/mL), perlakuan II (8 µg/mL), dan perlakuan III (80 µg/mL) berturut-turut 0,97 nmol, 0,6 nmol, dan 0,52 nmol/mL. Berdasarkan uji statistik, fraksi etanol pada perlakuan I (0,8 µg/mL) memiliki nilai yang berbeda nyata dengan semua perlakuan dan semua kontrol (normal, negatif, positif). Perlakuan II (8 µg/mL) memiliki nilai yang berbeda nyata dengan kontrol normal, kontrol negatif, perlakuan I, dan tidak berbeda nyata dengan kontrol positif dan perlakuan III (80 µg/mL). Dengan demikian, perlakuan II (8 µg/mL) memiliki aktivitas menghambat oksidasi *t*-BHP yang sebanding dengan kontrol normal. Perlakuan III (80 µg/mL) memiliki nilai berbeda nyata pada seluruh kontrol dan perlakuan I (0,8 µg/mL), namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan II (8 µg/mL).

Menurut Cysewski dan Lorenz (2000), astaxantin menunjukkan potensi antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan dengan β-karoten. Namun pada penelitian ini, astaxantin dalam ekstrak etanol *P. cruentum* tidak menunjukkan nilai yang lebih besar dari β-karoten pada ekstrak *n*-heksana. Hal ini dimungkinkan karena pelarut yang digunakan adalah berupa akuades dan tidak cukup baik untuk melarutkan ekstrak etanol (xantofil).

(3) Analisis aktivitas auperoxide dismutase

Superoxide dismutase (SOD) dapat diukur menggunakan spektrofotometer cahaya tampak dengan metode *Adrenochrome assay* pada panjang gelombang 480 nm. Prinsip kerja SOD dalam tubuh mempunyai aktivitas mengkatalisis radikal superoksida (O²) menjadi hidrogen peroksida dan oksigen. SOD menghambat terjadinya auto-oksidasi epinefrin menjadi adenokrom karena adanya dapar karbonat yang menyebabkan suasana menjadi basa, sehingga epinefrin yang stabil terhadap asam tersebut teroksidasi menjadi adenokrom (Winterbourn *et al.*, 1975). Berdasarkan hasil studi, aktivitas SOD sampel karoten dan xantofil ditampilkan pada Gambar 8.

Sebelum pengujian sampel kontrol maupun sampel uji/perlakuan, dilakukan pengukuran kadar SOD pada blanko. Blanko dalam pengujian ini berupa



Keterangan:

- Kontrol Normal : SDMD 10% + Pelarut (n-heksana/ Akuades) + KRP
 Kontrol Negatif : SDMD 10% + Pelarut (n-heksana/ Akuades) + t-BHP
 Kontrol Positif : SDMD 10% + Vitamin E/ Vitamin C + t-BHP
 Perlakuan 1 : SDMD 10% + Karoten (0,6 µg/mL) / Xantofil (0,8 µg/mL) + t-BHP
 Perlakuan 2 : SDMD 10% + Karoten (6 µg/mL) / Xantofil (8 µg/mL) + t-BHP
 Perlakuan 3 : SDMD 10% + Karoten (60 µg/mL) / Xantofil (80 µg/mL) + t-BHP

Gambar 8. Aktivitas *Superoxide dismutase* ekstrak *n*-heksana (karoten) dan etanol (xantofil) *P. crunetum*

dapar karbonat yang hanya diberi epinefrin yang akan menjadi adenokrom secara terus-menerus karena suasana basa yang ditimbulkan oleh dapar karbonat tanpa ada penghambat reaksi autooksidasi. Kondisi ini menyebabkan absorbansi semakin naik setiap menit.

Data penelitian menunjukkan, aktivitas SOD pada kontrol negatif menghasilkan aktivitas yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol maupun perlakuan lainnya. Hal ini disebabkan karena penambahan *t*-BHP sebagai radikal bebas atau oksidan pada sel darah merah domba dapat mengkatalisasi autooksidasi epinefrin menjadi adenokrom, sehingga aktivitas SOD dalam menghambat autooksidasi epinefrin menjadi berkurang (Winterbourn *et al.*, 1975).

Aktivitas SOD kontrol normal (Vitamin C dan E) pada kedua fraksi (Etanol dan *n*-heksana) lebih besar dibandingkan dengan kontrol negatif, berturut turut 33,643 unit dan 34,17 unit/mL. Hasil tersebut disebabkan oleh tidak adanya oksidan yang ditambahkan, sehingga tidak ada katalisator untuk proses auto-oksidasi. Pada kontrol positif, perlakuan I, II, dan III ditambahkan antioksidan. Meskipun sel darah merah domba mengalami stres oksidatif dengan adanya penambahan *t*-BHP, kontrol positif dan ekstrak dapat menghambat

auto-oksidasi, sehingga reaksi auto-oksidasi dapat dihambat.

Fraksi *n*-heksana pada kontrol normal memiliki nilai berbeda nyata dengan kontrol negatif, perlakuan II (6 µg/mL), dan perlakuan III (60 µg/mL). Pada kontrol negatif diperoleh nilai yang berbeda nyata dengan seluruh kontrol dan perlakuan. Pada kontrol positif terdapat nilai berbeda nyata dengan kontrol normal dan perlakuan II (6 µg/mL). Hal ini menunjukkan aktivitas *superoxide dismutase* pada kelompok kontrol positif, kontrol normal, dan perlakuan II (6 µg/mL) memiliki nilai yang tidak berbeda sebagaimana terbukti pada data uji *Tukey*.

Perlakuan I (0,6 µg/mL) memiliki aktivitas SOD 31,54 unit/ mL, tidak berbeda nyata dengan kontrol normal, sedangkan dengan perlakuan dan kontrol lain memiliki nilai berbeda nyata. Pada perlakuan II (6 µg/mL) aktivitas SOD terukur 39,16 unit/ mL, berbeda nyata dengan semua perlakuan, kontrol normal, dan kontrol negatif. Kontrol positif menunjukkan nilai yang tidak berbeda nyata. Pada perlakuan III (60 µg/mL) aktivitas SOD terukur 48,1 unit/ mL, berbeda nyata dengan semua kontrol dan semua perlakuan.

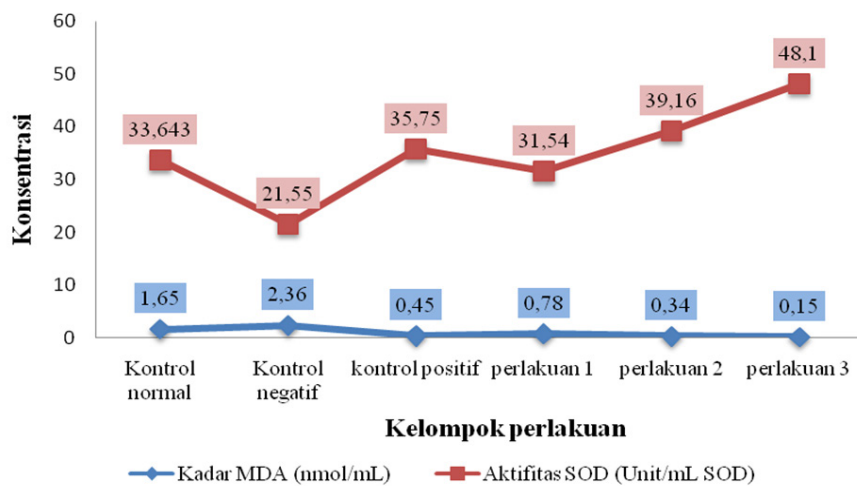
Nilai fraksi etanol pada kontrol normal tidak berbeda nyata dengan kontrol positif dan berbeda nyata dengan

seluruh perlakuan dan kontrol negatif. Kontrol negatif memiliki nilai yang berbeda nyata dengan kontrol lain dan seluruh perlakuan. Kontrol positif memiliki nilai yang berbeda nyata dengan kontrol negatif, perlakuan I (0,8 µg/mL), dan perlakuan III (80 µg/mL), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan II (8 µg/mL) dan kontrol normal. Pada perlakuan II (8 µg/mL), aktivitas SOD terukur 37,32 unit/mL, tidak berbeda nyata dengan kontrol positif, namun berbeda nyata dengan kontrol negatif, kontrol normal, perlakuan I dan II. Pada perlakuan I dan III, aktivitas SOD terukur berturut-turut 29,17 unit dan 42,58 unit/mL, berbeda nyata dengan seluruh kontrol dan perlakuan lainnya, sebagaimana ditunjukkan pada uji Tukey.

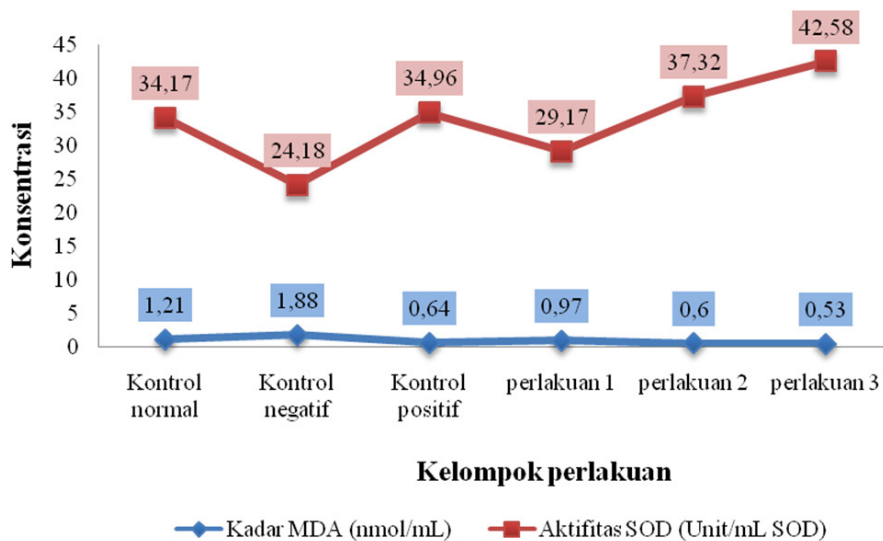
Korelasi antara Malondialdehyde dan Superoxide Dismutase.

Malondialdehyde yang terbentuk dan aktivitas SOD memiliki hubungan yang cukup erat. Jika nilai MDA suatu sampel tinggi maka aktivitas SOD menurun. Hubungan kadar MDA dan SOD pada fraksi *n*-heksana dan etanol dapat dilihat pada Gambar 9.

Perbandingan kadar *malondialdehyde* dan aktivitas *superoxidedismutase* fraksi etanol disajikan pada Gambar 10. Pada kontrol negatif kedua fraksi terdapat kenaikan kadar MDA yang cukup signifikan dibandingkan dengan kadar MDA sampel lainnya. Selain itu terjadi penurunan aktivitas SOD yang signifikan pula pada kontrol



Gambar 9. Perbandingan kadar *malondialdehyde* dan aktivitas *superoxide dismutase* fraksi *n*-heksana



Gambar 10. Kadar *malondialdehyde* dan aktivitas *superoxidedismutase* fraksi etanol

negatif. Nilai aktivitas SOD pada perlakuan I, II, dan III meningkat secara terus-menerus. Kondisi ini juga terjadi pada kadar MDA. Tujuan pengukuran MDA ialah melihat jumlah radikal bebas yang terdapat pada sampel, sedangkan pengukuran SOD menentukan seberapa besar sampel menangkal radikal bebas.

KESIMPULAN

Pigmen karoten dan xantofil yang berasal dari mikroalga *P. cruentum* mempunyai kemampuan sebagai antioksidan. Hal ini membuktikan karoten dan xantofil dapat menurunkan kadar MDA dan meningkatkan aktivitas SOD pada sel darah merah domba yang mengalami stres oksidatif.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sdr. Cristian yang telah membantu pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N.W.S dan Kusmiati. 2016. Ethyl acetate extract of microalgae *Porphyridium cruentum* potentially as antioxidant and toxicity. Proceeding Basic "The 6th Basic science international conference. Faculty of Mathematics and Sciences Brawijaya University 6:278-290.
- Baskar, R., V. Rajeswari, and T.S Kumar. 2007. In vitro antioxidant studies in leaves of annona species. *Indian J. Exp. Biol.* 45: 480-485.
- Becker, E.W. 1994. *Microalga, Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. Page 34-39.
- Cysewski, G.R. and R.T Lorenz. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as natural source of astaxanthin. *Trend In Bitechology* 18: 160-167.
- del Campo, A.J., M. Garcia-González, and M.G Guerrero. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: Current state and perspectives. *Apply Microb Biotechnol.* 74: 1163-1174.
- Fuentes, R., A. Fernandez, and J.A Perez. 2000. Biomass Nutrient Profiles of The Microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry* 70: 345-353.
- Halliwell, B. and J.M.C Gutteridge. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press. Page 105-106.
- Harbone, J.B. 1986. *Metode Fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Edisi 2. Diterjemahkan oleh Padmawinata, K., Soediro, I. Bandung: ITB Press.
- Hirschberg, J., M.Cohen, M. Harker, T. Lotan, V. Mann, and I. Pecker. 1997. Molecular genetics of the carotenoid biosynthesis pathway in plants and algae. *Pure and Appl Chem.* 10: 2151.
- Indah, M. 2008. Efek Karotenoid sebagai Antioksidan dari Mikroalga *D. Salina* terhadap Aktivitas SOD (*Superoksid Dismutasi*) dan Kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada Sel Darah Merah Domba yang Diberi Stres Oksidatif In Vitro. [Skripsi]. Jakarta: Universitas Muhammadiyah Prof. DR. Hamka. Halaman 32-34.
- Janero, D.R. 2001. Malondialdehyde and Thiobarbaturic Acid Activity as Diagnosis Indices of Lipid Peroxidation and Peroxidative Tissues Injury. *Free Radical Biology and Medicine* 9: 515-540.
- Kiokias, S., C. Proestos, and Varzakas. 2016. A Review of the Structure, Biosynthesis, Absorption of Carotenoids-Analysis and Properties of their Common Natural Extracts. *Current Research in Nutrition and Food Science* 4:25-37.
- Lee, R.S. 2008. *Phycology*. New York: Cambridge University Press. Page 95.
- Lestario, L.N., S. Stefanli, and K.H Timotius. 2008. Aktivitas antioksidan dan kadar fenolik total dari ganggang merah (*Gracillaria verucosa* .L). *Jurnal Teknol dan Industri Pangan* 19 (2): 131-138.
- Li, H.B., J. You, and C. Feng. 2002. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by extraction after saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1: 1070-1072.
- Nisma, F., A. Situmorang, dan M Fajar. 2010. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) berdasarkan aktivitas SOD (*Superoxid Dismutase*) dan kadar MDA (*Malondialdehyde*) pada sel darah merah domba yang mengalami stres oksidatif in vitro. *Farmasains* 1: 1. Halaman 18-24.
- Parinussa, T.M. dan F.S Rondonuwu. 2009. Analisis kandungan karotenoid buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) pada suhu pemanasan yang berbeda. Prosiding Seminar Nasional kimia dan pendidikan kimia 2009. Jawa Tengah: Magister Biologi Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga. 1: 473-486.
- Perace, E. 2000. *Anatomi dan Fisiologi untuk Paramedis*. Jakarta: PT Gramedia. Halaman 243-307.
- Pham-Huy, L.A., H. Hua, and C. Pham-Huy. 2008. Free radicals, antioxidants in diseases and health. *Int J Biomed Sci.* 4 (2) : 89-96.

- Sayuti, K. dan R. Yenrina. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.
- Sunarni, T., P. Suwidjiyo dan A. Ratna. 2007. Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. and Th., *Majalah Farmasi Indonesia* 3 (18): 111-116.
- Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: Kansius.
- Winterbourn, C., R. Hawkins, M. Brian, and R. Carrel. 1975. The Estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J Lab Clin Med.* 1: 85, 337.
- Yunus, M. 2001. Pengaruh antioksidan vitamin C terhadap MDA eritrosit tikus wistar akibat latihan anaerobik. *Jurnal Pendidikan Jasmani.* 1: 9-16.
- Zakynthinos, G. and T. Varzakas. 2016. Carotenoids: From Plants to Food Industry. *Current Research in Nutrition and Food Science.* 4: 38-51.