

4.5 Antioksidan

Radikal bebas menyebabkan biomolekul seperti asid lemak di membran mengalami pengoksidaan dan mengakibatkan pengurangan kebendaliran pada membran, kehilangan enzim serta mengganggu aktiviti reseptor dan kerosakan pada protein membran yang menyebabkan pentakaktifan sel (Dean dan Davies, 1993). Kerosakan pada biomolekul seperti protein, lipid, lipoprotein dan DNA yang disebabkan oleh radikal bebas merupakan faktor pemula kepada beberapa jenis penyakit kronik seperti diabetes mellitus, kanser, arterosklerosis, arthritis, radang, penyakit degeneratif saraf dan juga mempercepatkan proses penuaan (Hogg, 1998; Pong, 2003).

Antioksidan adalah molekul yang merencat atau melambatkan proses pengoksidaan dengan menghalang pemula atau penambahan tindakbalas rantaian oksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Maka penggunaan antioksidan sebagai langkah pencegahan awal kepada penyakit degeneratif menjadi tumpuan utama dalam penyelidikan masa kini (Tutour, 1990; Ames *et al.*, 1993; Joseph *et al.*, 1999).

Antioksidan juga digunakan dalam industri makanan sebagai bahan tambahan untuk melambatkan pengoksidaan. Penambahan antioksidan sintetik membolehkan makanan disimpan dengan lebih lama (Tsuda *et al.*, 1994). Namun begitu, penggunaan antioksidan sintetik telah dihadkan kerana kesan karsinogenisitinya (Grice, 1986; Wichi, 1988; Madhavi dan Salunkhe, 1995). Maka, banyak kajian dilakukan untuk mencari antioksidan dari bahan semulajadi yang dipercayai lebih selamat untuk digunakan (Adegoke *et al.*, 1998; Dorman dan Hiltunen, 2004; Reddy *et al.*, 2005).

4.5.1 Ujian Antioksidan

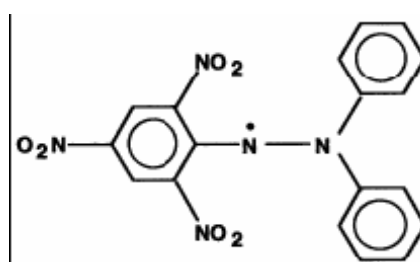
Asai untuk ujian antioksidan yang sering digunakan terdapat dalam pelbagai jenis kaedah bergantung kepada mekanisma yang berbeza dan juga jenis oksidan/antioksidan yang terlibat berbeza pada sifat fizikal dan kimianya serta keseimbangan lipofilik/hidrofilik (Frankel *et al.*, 1994; Mathew dan Abraham, 2006). Penggunaan lebih daripada satu asai untuk ujian antioksidan ke atas ekstrak tumbuhan adalah perlu kerana sifat fitokimianya yang kompleks (Chu *et al.*, 2000; Nuutila *et al.*, 2003). Maka, dalam kajian ini tiga jenis asai digunakan untuk mengesan aktiviti antioksidan pada ekstrak metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. iaitu:-

- i. Asai Pelupusan Radikal Bebas Difenil Pikril Hidrazil (DPPH)
- ii. Asai Pengurangan Kuasa
- iii. Asai Pelunturan β -karotena

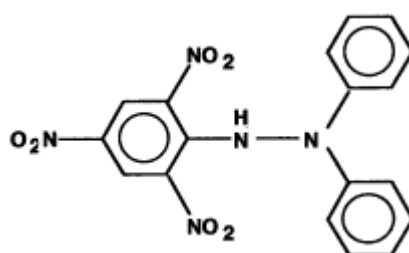
4.5.2 Asai Pelupusan Radikal Bebas Difenil Pikril Hidrazil (DPPH)

Potensi aktiviti antioksidan oleh ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dikaji dengan kaedah pelupusan molekul radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). DPPH (Rajah 4.18) adalah radikal bebas yang stabil dan tidak akan bertindak balas dengan rantaian reaktif lain yang hadir seperti pengkelatan ion logam dan perencatan enzim (Amarowicz *et al.*, 2004). Radikal bebas ini memberikan jalur penyerapan yang kuat pada absorbans 517 nm dengan warna violet yang terang dan ia berkeupayaan untuk menerima elektron atau atom hidrogen dari molekul antioksidan.

DPPH yang telah dilupuskan berubah menjadi difenilpikril hidrazina yang bukan radikal (Rajah 4.19), warnanya semakin pudar serta kesan penyerapan semakin berkurangan. Penurunan nilai absorbans adalah berkadar langsung dengan bilangan molekul DPPH yang telah dilupuskan. Ciri-ciri inilah yang digunakan untuk menilai aktiviti antioksidatif pada sesuatu antioksidan. (Chen *et al.*, 1995; Soares *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1998; Gordon, 2001).



Rajah 4.18: Radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)



Rajah 4.19: Difenilpikril hidrazina

Ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. diuji dengan ujian pra-penyaringan terlebih dahulu untuk menentukan sama ada ia boleh memberikan kesan pelupusan ke atas radikal bebas DPPH pada kepekatan 5 mg/ml. Ujian pra-penyaringan juga dijalankan ke atas asid askorbik dan BHA sebagai rujukan positif. Asid askorbik dan BHA adalah antioksidan yang dihasilkan secara sintetik.

Jadual 3.17 menunjukkan rencatan (I%) pada 50% terhadap radikal bebas DPPH oleh asid askorbik dan BHA pada kepekatan 5 mg/ml iaitu $92.25 \pm 1.10\%$ dan $91.53 \pm 1.15\%$. Kedua-dua ekstrak menunjukkan rencatan (I%) pada 50% dan lebih apabila diuji pada kepekatan 5 mg/ml, maka terbukti bahawa *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. mempunyai aktiviti antioksidan. Diantara kedua-dua sampel, ekstrak *Cassia tora* L. menunjukkan pelupusan radikal bebas yang lebih tinggi daripada ekstrak *Cassia alata* L. dengan nilai $92.96 \pm 1.88\%$ berbanding dengan $92.82 \pm 1.79\%$.

Nilai kepekatan rencatan 50 (IC_{50}) bagi ekstrak *Cassia alata* L. adalah 0.825 mg/ml dan 0.744 mg/ml untuk *Cassia tora* L. Bagi bahan rujukan positif yang digunakan pula, asid askorbik memberikan nilai IC_{50} dengan 0.115 mg/ml dan butil hidroksianisol (BHA) pula ialah 0.156 mg/ml (Jadual 3.20). Rajah 3.20 menunjukkan aktiviti pelupusan radikal bebas DPPH oleh asid askorbik dan BHA. Rajah 3.19 menunjukkan pelupusan radikal bebas DPPH oleh ekstrak mentah metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. pada kepekatan 1.0 – 5.0 mg/ml. Peningkatan pelupusan terhadap radikal bebas DPPH oleh kedua-dua ekstrak berlaku apabila kepekatan ekstrak ditingkatkan

Hasil kajian ini membuktikan bahawa ekstrak metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. mempunyai ciri antioksidan kerana keupayaannya melupuskan radikal bebas DPPH melalui pendermaan atom hidrogen atau elektron. Aktiviti antioksidan ini adalah kesan pergantungan dos dimana aktiviti pelupusan radikal bebas meningkat apabila kepekatan ekstrak meningkat.

Kajian yang dilakukan oleh Siddhuraju *et al.*, (2002) mendapati aktiviti pelupusan (I%) ekstrak etanol daun *Cassia fistula* L. adalah lebih rendah daripada hasil kajian ini iaitu 79.9% tetapi ekstrak metanol batangnya menunjukkan aktiviti yang lebih kuat dengan aktiviti pelupusan (I%) sebanyak 93%. Dipercayai, aktiviti antioksidan oleh *Cassia fistula* L. ke atas radikal bebas DDPH disebabkan oleh kandungan taninnya yang tinggi dan juga terdapat sebatian kimia flavonol serta xanton (Gupta *et al.*,1989; Kashiwada *et al.*, 1990).

Kumaran dan Karunakaran (2007), melaporkan nilai kepekatan rencatan 50 (IC₅₀) bagi ekstrak etanol bunga *Cassia auriculata* L. adalah 55.45 mg/ml manakala ekstrak metanol pula adalah 52.41 mg/ml. Keputusan yang dilaporkan oleh mereka adalah lebih besar nilainya berbanding dengan hasil yang diperolehi dari kajian ini. Ini menunjukkan bahawa potensi antioksidan *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. adalah lebih baik berbanding *Cassia auriculata*.

4.5.3 Asai Pengurangan Kuasa

Arabshahi-Delouee dan Urooj (2007), mencadangkan keupayaan pendermaan elektron oleh komponen bioaktif menunjukkan ia juga mempunyai keupayaan untuk mengurangkan kuasa dan berkait rapat dengan aktiviti antioksidan. Antioksidan berfungsi sebagai agen penurunan dimana ia akan menurunkan agen pengoksida menjadi tidak aktif dan proses pengoksidaan akan terhenti.

Dalam asai ini, kehadiran agen penurunan seperti antioksidan pada sampel menyebabkan kompleks feriksianida/ Fe^{3+} pada garam ferik mengalami proses penurunan kepada bentuk ferus/ Fe^{2+} . Kehadiran Fe^{2+} boleh dikesan dengan memantau penghasilan warna biru Prusian Perl secara spektrofotometri pada absorbans 700 nm (Chung *et al.*, 2002). Warna larutan ujian akan berubah dari warna kuning kepada pelbagai jenis warna hijau dan biru bergantung kepada pengurangan kuasa yang dihasilkan oleh ekstrak sampel. Keupayaan sebatian kimia yang terdapat pada sampel untuk bertindak sebagai agen penurunan menunjukkan potensi aktiviti antioksidannya.

Pengurangan kuasa oleh setiap ekstrak menunjukkan berlakunya peningkatan apabila kepekatan ekstrak meningkat. Begitu juga dengan aktiviti yang dihasilkan oleh Asid askorbik dan BHA iaitu pengurangan kuasa meningkat sejajar dengan peningkatan kepekatan. Di antara kedua-dua ekstrak, *Cassia tora* L. menunjukkan aktiviti yang paling tinggi diikuti dengan *Cassia alata* L. seperti yang ditunjukkan dalam Rajah 3.21. Pengurangan kuasa oleh ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. pada kepekatan 20 mg/ml ialah 1.605 ± 0.25 dan 1.708 ± 0.21 . Manakala pengurangan kuasa oleh Asid askorbik dan BHA pada kepekatan 20 mg/ml ialah 1.975 ± 0.05 dan 1.787 ± 0.07 .

Pengurangan kuasa oleh ekstrak *Cassia tora* L. pada kepekatan 20 mg/ml adalah hampir dengan pengurangan kuasa BHA pada kepekatan 15 mg/ml iaitu 1.725 ± 0.10 .

Siddhuraju *et al.*, (2002), melaporkan ekstrak batang *Cassia fistula* L. menunjukkan pengurangan kuasa yang paling tinggi diikuti ekstrak daun dengan pengurangan kuasa yang sederhana manakala ekstrak bunga pula menunjukkan sedikit sahaja pengurangan kuasa. Aktiviti antioksidan adalah kesan pergantungan dos dimana peningkatan pengurangan kuasa berlaku apabila kepekatan ekstrak bertambah. Hasil kajian yang dilaporkan itu adalah sama dengan keputusan yang diperolehi dari kajian ini dimana pengurangan kuasa oleh ekstrak daun sampel *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. adalah sederhana.

Pengurangan kuasa oleh ekstrak bunga *Cassia siamea* juga adalah kesan pergantungan kepada dos (Kaur *et al.*, 2006). Zhenbao *et al.*, (2006), melaporkan ekstrak etil asetat biji *Cassia tora* L. mempunyai aktiviti pengurangan kuasa yang tinggi iaitu 2.51 pada kepekatan 0.2 mg/ml lebih tinggi dari hasil kajian ini. Menurut Yen *et al.*, (2000) pengurangan kuasa sebatian kimia antron dan alizarin adalah tinggi berbanding dengan sebatian kimia antrakuinon yang lain.

Walaupun pengurangan kuasa kedua-dua ekstrak adalah lebih rendah daripada yang dihasilkan oleh Asid askorbik dan BHA namun ia membuktikan bahawa ekstrak metanol daun *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. boleh berfungsi sebagai penderma elektron dan bertindakbalas terhadap radikal bebas dengan mengubahnya menjadi lebih stabil dan seterusnya menghentikan rantaian reaktif radikal bebas.

4.5.4 Asai Pelunturan β -karotena

Asai ini menggunakan sistem model pengoksidaan teraruh haba pada emulsi akueus β -karotena dan asid linoleik. Semasa pengoksidaan, struktur aktif bis-alilik kumpulan metilena pada asid linoleik mengalami kehilangan atom hidrogen dan radikal bebas pentadinil terhasil. Radikal bebas ini akan mengambil atom hidrogen dari molekul β -karotena (Frankel, 1998). Ini menyebabkan molekul β -karotena kehilangan ikatan ganda duanya dan warna jingga karotenoid menjadi semakin pudar (Jayaprakasha *et al.*, 2001).

Pelunturan warna jingga molekul β -karotena boleh diukur secara spektrofotometri dengan penurunan bacaan absorbans. Antioksidan berfungsi sebagai agen penurun dan ia akan menghalang pelunturan β -karotena dengan meneutralkan radikal bebas yang hadir dalam sistem tersebut (Suja *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Mekanisma ini digunakan untuk mengukur potensi antioksidan pada sesuatu ekstrak tumbuhan.

Dalam kajian ini aktiviti antioksidan ekstrak metanol daun *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. dikaji dan keputusan yang diperolehi ditunjukkan pada Rajah 3.22. Didapati bahawa peningkatan aktiviti antioksidan setiap sampel berlaku apabila kepekatan ekstrak meningkat. Aktiviti antioksidan *Cassia alata* L. adalah dalam lingkungan 72.46-84.45 % pada kepekatan 4-20 mg/ml manakala aktiviti antioksidan *Cassia tora* L. pula adalah dalam lingkungan 67.09-81.37 % pada kepekatan yang sama.

Ekstrak *Cassia alata* L. menunjukkan aktiviti antioksidan yang lebih tinggi dengan aktiviti $84.45 \pm 8.82\%$ pada kepekatan 20 mg/ml berbanding ekstrak *Cassia tora* L. yang aktiviti maksimumnya adalah $81.37 \pm 9.56\%$. Antioksidan sintetik iaitu BHA pula menunjukkan aktiviti antioksidan sebanyak $91.81 \pm 2.10\%$. Hasil yang diperolehi menunjukkan aktiviti antioksidan maksimum *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. adalah hampir dengan aktiviti antioksidan BHA pada kepekatan 16 mg/ml iaitu $82.21 \pm 1.19\%$.

Berdasarkan keputusan yang diperolehi, dapat dibuat kesimpulan bahawa *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. mengandungi sebatian kimia yang boleh bertindak sebagai antioksidan dan berupaya untuk mengurangkan atau menghalang pelunturan β -karotena dengan bertindak ke atas radikal bebas yang hadir.

4.5.5 Jumlah Sebatian Fenolik

Menurut Hall dan Cuppett (1997), keupayaan melupuskan radikal bebas dan spesies reaktif oksigen oleh kebanyakan ekstrak tumbuhan adalah kerana kandungan fenoliknya yang tinggi. Rice-Evans *et al.*, (1995), menyatakan bahawa kebanyakan sebatian kimia fenolik mempunyai ciri-ciri sebagai agen penurunan, berkeupayaan untuk menderma atom hidrogen dan juga melupuskan oksigen tunggal. Laporan lain juga menyokong kaitan antara keupayaan antioksidan sesuatu ekstrak tumbuhan dengan kehadiran sebatian kimia fenolik seperti metil orsenilat, asid orsenilik, atranorin dan asid lekanorik (Jayaprakasha dan Rao, 2000).

Jumlah kandungan sebatian fenolik pada ekstrak metanol *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. ditentukan dengan menggunakan kaedah Folin-Ciocalteu. Keluk piawai asid galik disediakan dan keputusan dinyatakan sebagai mg GAE (sama amaun asid galik)/L seperti dalam Jadual 3.25 dan Rajah 3.23. Berdasarkan keputusan yang diperolehi didapati kandungan sebatian kimia fenolik ekstrak *Cassia tora* L. adalah lebih tinggi iaitu sebanyak 51.43 ± 0.96 mg GAE/L berbanding ekstrak *Cassia alata* L. yang hanya mengandungi sebatian kimia fenolik sebanyak 47.49 ± 1.50 mg GAE/L. Tetapi, jumlah kandungan sebatian kimia fenolik yang dikesan dalam kedua-dua ekstrak adalah kurang daripada 100 mg GAE/L.

Ini menunjukkan korelasi diantara kehadiran sebatian fenolik dengan aktiviti antioksidan oleh kedua-dua ekstrak adalah rendah walaupun ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. mencatatkan aktiviti antioksidan yang tinggi dalam ketiga-tiga asai antioksidan. Namun begitu, terdapat beberapa kajian terdahulu melaporkan sebatian bukan fenolik juga turut menyumbang aktiviti antioksidan ekstrak (Harish dan Shivanandappa, 2005; Mariko *et al.*, 2005). Jang *et al.*, (2007), pula mencadangkan beberapa kemungkinan yang menjadi mekanisma kepada degradasi sebatian fenolik seperti peningkatan suhu tempat simpanan sampel menyebabkan penurunan kandungan sebatian fenolik ekstrak tumbuhan dan tempoh penyimpanan sampel yang lama juga memberikan kesan kepada kestabilan komponen antioksidan yang mungkin mengalami penguraian secara kimia dan enzimatik.

4.5.6 Ujian Antioksidan Secara Kuantitatif

Sebatian kimia yang telah dipencilkan dari ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. iaitu sebatian kimia CA-10 dan sebatian kimia CT-16 dijalankan ujian antioksidan secara kuantitatif dengan menggunakan asai pelupusan radikal bebas DPPH kerana ia hanya menggunakan kuantiti sampel yang sedikit sahaja. Nilai kepekatan rencatan 50 (IC₅₀) kedua-dua sebatian kimia diperolehi (lihat Rajah 3.24). Nilai IC₅₀ bagi sebatian kimia CT-16 ialah 21 µg/ml manakala nilai IC₅₀ bagi sebatian kimia CA-10 pula tidak dapat ditentukan.

Sebatian kimia CT-16 adalah kaempferol (**3**) iaitu sejenis flavanoid manakala sebatian kimia CA-10 pula ialah emodin (**9**) dari kumpulan antrakuinon. Hasil kajian ini sama dengan hasil kajian yang telah dijalankan oleh Zhang *et al.*, (2005), dimana sebatian flavanoid yang dipencilkan dari bunga *Reynoutria sachalinensis* menunjukkan aktiviti antioksidan yang lebih baik dari sebatian antrakuinon yang juga dipencilkan dari sampel yang sama.

Ibrahim *et al.*, (2008) melaporkan sebatian kaempferol (**3**) yang dipencilkan dari *Nerium oleander* L. memberikan nilai IC₅₀ 0.21 µg/ml tanpa sebarang kesan sitotoksik pada kepekatan 31.25 µg/ml. Panichayupakaranant dan Kaewsuan (2004), juga melaporkan aktiviti pelupusan radikal bebas DPPH oleh sebatian kaempferol (**3**) dari daun *Cassia alata* L. adalah lebih tinggi dengan nilai dos efektif 50 (ED₅₀) 578.87±2.86 mM berbanding dengan sebatian emodin (**9**) hanya mencatat nilai ED₅₀ 9.99±0.28 mM.

Aktiviti antioksidan oleh sebatian flavanoid adalah lebih baik disebabkan terdapat ikatan ganda dua pada gelang-C dan kehadiran kumpulan hidroksil pada kedudukan *orto* atau *para* pada sebatian tersebut (Kajiyama dan Ohkatsu, 2001; Hou *et al.*, 2004). Choi *et al.*, (1994), melaporkan bahawa kesemua sebatian antrakuinon iaitu krisofanol (**8**), emodin (**9**), physion (**10**), chryso-obtusin, aurantio-obtusin dan krisofanol glikosida yang dipencilkan dari biji *Cassia tora* L. kecuali alaternin tidak aktif ke atas radikal bebas DPPH Mereka melaporkan, ini adalah disebabkan oleh kekurangan kumpulan hidroksil pada struktur sebatian mempengaruhi kesan pelupusan oleh sebatian antrakuinon ke atas radikal bebas DPPH.

Berdasarkan keputusan yang diperolehi dapat disimpulkan bahawa kehadiran sebatian flavanoid memberikan pengaruh yang lebih tinggi kepada aktiviti antioksidan oleh ekstrak *Cassia alata* L. dan *Cassia tora* L. berbanding sebatian antrakuinon yang merupakan sebatian kimia utama dalam kebanyakan tumbuhan spesies *Cassia*.