

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Alga

Suatu organisme tunggal ataupun multiseluler yang berhabitat di air atau tempat yang lembab disebut dengan alga. Alga mempunyai kandungan klorofil didalamnya sehingga dapat berfotosintesis. Alga termasuk ke dalam kelompok autotrofik yang mana mampu menghasilkan makanannya sendiri melalui proses anabolik (Pereira, 2021). Alga dikelompokkan menjadi makroalga dan mikroalga. Makroalga merupakan suatu organisme multiseluler yang mempunyai ukuran panjang hingga 60 meter. Mikroalga merupakan suatu organisme uniseluler yang mempunyai ukuran mulai dari 1 mm-cm (Biris-Dorhoi *et al.*, 2020).

2.2 Makroalga

Makroalga adalah salah satu organisme yang termasuk ke dalam kelompok eukariotik kompleks, namun tidak mempunyai struktur dan reproduksi seperti tanaman yang habitatnya di darat (Saidi & Azara, 2023). Makroalga mempunyai ciri makroskopik yang panjangnya bisa mencapai beberapa meter. Bentuk atau morfologi dari makroalga yaitu talus. Talus merupakan bentuk dari tubuh tumbuhan yang tidak dapat berdiferensiasi menjadi batang dan daun, serta tidak memiliki akar sejati dan sistem pembuluh darah (Pereira, 2021). Cabang-cabang dari makroalga berbentuk silinder, ketika masih hidup akan berwarna hijau-kuning kemerahan, namun ketika kering akan berubah warnanya menjadi kuning kecoklatan. Percabangannya tidak teratur, teksturnya kasar karena terdapat nodula atau spine yang tumbuh (Saidi & Azara, 2023).

Makroalga mengandung komponen seperti karbohidrat, protein, dan lemak. Selain itu, di dalam makroalga terdapat kandungan vitamin A, tiamin, riboflavin, piridoksin, cyanocobalamin, C, dan mineral seperti kalium, Na, kalsium, fosfor besi, serta iodium. Kandungan nutrisi serta antioksidan yang tinggi menghasilkan manfaat yang baik bagi kesehatan. Makroalga atau rumput laut dapat bermanfaat dalam meningkatkan fungsi tiroid, meningkatkan kesehatan jantung, menjaga kestabilan kadar glukosa darah, menurunkan berat badan, meningkatkan imunitas,

meningkatkan kesehatan usus, dan dapat menurunkan risiko terjadinya penyakit kanker. Selain itu, makroalga dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan, industri farmasi, dan kosmetik (Saidi & Azara, 2023).

Klasifikasi makroalga berdasarkan klorofil dan kandungan pigmennya dibagi menjadi 4 divisi, yaitu *Chlorophyta*, *Rhodophyta*, *Phaeophyta*, dan *Chrysophyta*. Karakteristik makroalga setiap filum yaitu sebagai berikut (Husni & Budhiyanti, 2021):

1. *Chlorophyta*

Chlorophyta atau rumput laut hijau mempunyai ciri-ciri yaitu:

- a. Beberapa organisme uniseluler dan terdapat juga yang membentuk koloni.
- b. Bentuk morfologi tubuhnya yaitu bulat, berfilamen, lembaran, dan ada juga yang menyerupai tumbuhan tinggi.
- c. Kloroplas mempunyai berbagai bentuk dan ukuran, seperti mangkuk, jala, busa, dan bintang.
- d. Pada sel reproduktif terdapat stigma.
- e. Terdapat vakuola kontraktil di dalam sel sitoplasma.
- f. Inti sel mempunyai dinding yang disebut dengan eukarion.
- g. Zat penyusun dinding selnya yaitu selulosa.

Rumput laut hijau ini dapat tumbuh di perairan tawar, laut, tanah yang basah, serta tempat kering. Rumput laut ini mampu menghasilkan makanannya sendiri (autotrof). Pigmen yang terkandung dalam *Chlorophyta* yaitu klorofil a, b, β -karoten, dan xantofil. Contoh rumput laut tersebut antara lain *Caulerpa* sp., *Codium* sp., *Halimeda* sp., *Chaetomorpha* sp., *Cladophora* sp., *Ulva* sp., dan *Enteromorpha* sp. Manfaat dari rumput laut ini yaitu sebagai sumber makanan dan dapat digunakan sebagai obat.

2. *Phaeophyta*

Phaeophyta atau rumput laut coklat mempunyai ciri-ciri yaitu:

- a. Talus yang berukuran mikroskopis dan makroskopis.
- b. Bentuknya ada yang tegak, bercabang, dan benang/filamen yang tidak bercabang.
- c. Mempunyai kloroplas yang tunggal.

- d. Mempunyai pirenoid di dalam kloroplas.
- e. Dinding sel terdiri atas lapisan selulosa pada bagian dalam dan *gumi* merupakan penyusun bagian luar. Zat penyusun dinding selnya yaitu asam alginat.
- f. Mempunyai jaringan xilem yang mirip dengan tanaman yang hidup di daratan.

Rumput laut coklat dapat tumbuh di dalam air laut yang kondisi suhunya cukup dingin, dan terdapat pula sebagian kecil yang hidup di dalam air tawar. Rumput laut coklat hidup secara autotrof. Pigmen warna yang terkandung didalamnya yaitu fukosantin, klorofil-A, klorofil-C, violasantin, β -karoten, dan *diadinoxanthin*. Contoh rumput laut kelompok ini yaitu *Dictyota* sp., *Padina* sp., *Ascophyllum* sp., *Fucus* sp., *Sargassum* sp., *Turbinaria* sp., *Cytoseira* sp., dan *Laminaria* sp. Manfaat dari rumput laut coklat yaitu dapat digunakan sebagai campuran dalam pembuatan *ice cream*, cat, obat, dan lateks sintetis.

3. *Rhodophyta*

Rhodophyta atau rumput laut merah mempunyai ciri yaitu:

- a. Berwarna merah-ungu, lembayung
- b. Talus yang berupa helaian atau bentuknya seperti pohon.
- c. Tidak mempunyai flagela.
- d. Dinding sel tersusun berlapis-lapis, bagian dalam terdiri dari mikrofibril, bagian luar terdiri dari lendir. Kandungan yang terdapat dalam dinding sel yaitu polisakarida yang tebal. Zat penyusun dinding sel adalah CaCO_3 , selulosa, dan hasil fotosintesis yang berupa karagenan, agar, fulselaran, dan porpiran.
- e. Mempunyai pigmen fotosintetik fikobilin dan mempunyai pirenoid.

Rumput laut merah ini umumnya berada di laut yang dalam, air tawar, dan dalam tanah. Rumput laut ini biasanya sebagai penyusun dari terumbu karang laut dalam. Rumput laut ini bersifat autotrof, namun ada juga yang bersifat heteroautotrof. Pigmen yang terdapat pada makroalga ini adalah klorofil A, klorofil B, karotenoid, dan fikobiliprotein (fikoeritrin dan fikosianin).

4. *Chrysophyta*

Chrysophyta mempunyai pigmen berupa karoten dan xantofil. Rumput laut ini dapat hidup di laut dan air tawar. Zat penyusun dinding selnya yaitu silikon.

2.3 Tinjauan Makroalga *Eucheuma cottonii*

2.3.1 Klasifikasi

Menurut Anggadireja (2009) dalam (Wibowo *et al.*, 2014), klasifikasi dari *Eucheuma cottonii* yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Rhodophyta
Kelas	: Rhodophyceae
Ordo	: Gigartinales
Famili	: Solieraceae
Genus	: Eucheuma
Spesies	: <i>Eucheuma cottonii</i> (<i>Kappaphycus alvarezii</i>)

2.3.2 Morfologi



Gambar 2. 1 Makroalga *Eucheuma cottonii* (Sumber: koleksi pribadi)

Bentuk morfologi dari makroalga *Eucheuma cottonii* yaitu mempunyai bentuk talus yang silinder, cartilaginous, tekstur permukaannya licin, warna dari makroalga ini ada yang berwarna hijau, kuning, abu-abu, merah, serta menempel pada substrat dengan alat perekat berbentuk cakram (Nikmah, 2019). Talus memiliki duri yang panjang dan runcing, agak jarang, tetapi susunannya tidak melingkar. Makroalga *Eucheuma cottonii* mempunyai cabang ke berbagai arah

dengan batang utama yang keluar dan saling berdekatan pada bagian pangkal (basal). Cabang-cabang tersebut berbentuk memanjang atau melengkung seperti tanduk, dan untuk cabang pertama dengan kedua tumbuh ke arah sinar matahari. *Eucheuma cottonii* biasanya tumbuh dengan baik pada daerah terumbu karang. Tempat hidup yang khas dari makroalga ini adalah kawasan dengan kondisi aliran air laut konstan dan substrat batuan karang mati (Wibowo *et al.*, 2014).

2.3.3 Kandungan dan Manfaat

Eucheuma cottonii mempunyai kandungan air, lemak, protein, karbohidrat, α tokoferol, mineral, vitamin C, vitamin E, dan zat aktif seperti golongan flavonoid, steroid/ terpenoid, alkaloid, fenol, hidrokuinon, triterpenoid, dan saponin. Selain itu, *Eucheuma cottonii* mengandung karaginan sekitar 54-73% (Wibowo *et al.*, 2014; Maharany *et al.*, 2017; Agusman *et al.*, 2022).

Senyawa yang terkandung *Eucheuma cottonii* telah banyak dimanfaatkan untuk bahan makanan, kosmetika, dan obat-obatan tradisional (Wibowo *et al.*, 2014). Pemanfaatan untuk kosmetik antara lain dapat diformulasikan dalam pembuatan krim anti-aging, krim wajah, krim tabir surya, *skin lotion*, pasta gigi, penstabil pada sabun (Yanuarti *et al.*, 2017). Selain untuk kosmetik, *Eucheuma cottonii* mempunyai fungsi sebagai antiinflamasi, antibakteri, antioksidan, dan mampu menghambat virus (Wulandari *et al.*, 2018).

2.4 Simplisia

Simplisia adalah bahan alami yang telah dikeringkan namun belum melalui pengolahan apapun. Simplisia dapat bermanfaat untuk proses pengobatan. Proses pengeringan yang dilakukan yaitu dengan cara dijemur di bawah cahaya matahari, diangin-anginkan, atau dikeringkan menggunakan oven. Kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan menggunakan oven tidak lebih dari 60° (Kementerian Kesehatan RI, 2017). Klasifikasi dari simplisia terdiri atas simplisia nabati, hewani, dan pelikan (mineral) (Departemen Kesehatan RI, 1978).

Simplisia nabati merupakan simplisia yang mencakup tanaman secara utuh, bagian tertentu dari tanaman, dan eksudat tanaman. Eksudat merupakan kandungan dari isi sel yang keluar dari tanaman secara spontan atau isi sel yang dikeluarkan

dengan menggunakan cara yang telah ditentukan. Selain itu, eksudat juga merupakan zat-zat nabati lainnya yang dipisahkan dari tanaman dengan menggunakan cara tertentu dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia hewani merupakan simplisia yang berupa hewan utuh, bagian tertentu dari hewan, atau zat bermanfaat yang dihasilkan oleh hewan, namun belum dalam bentuk zat kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) merupakan simplisia yang berasal bahan mineral yang belum diolah ataupun telah dilakukan pengolahan secara sederhana serta berbentuk suatu zat kimia yang belum murni (Departemen Kesehatan RI, 1978).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan satu senyawa atau lebih dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Mekanisme yang terjadi pada proses ekstraksi yaitu masuknya pelarut ke bagian dalam dari sel, sehingga terjadi pelarutan zat aktif yang terkandung di dalamnya. Masuknya pelarut ke dalam sel akan menimbulkan proses difusi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi perlu memenuhi syarat seperti harga terjangkau, mudah didapatkan, bersifat stabil secara fisika dan kimia, inert, selektif, dan diperbolehkan dalam aturan. Sifat pelarut yang akan digunakan harus disesuaikan dengan sifat zat aktif yang akan diekstraksi. Oleh karena itu, perlu mengetahui tingkat kepolaran zat aktifnya (Najib, 2018).

2.5.1 Metode Ekstraksi Maserasi

Metode ekstraksi maserasi adalah suatu metode ekstraksi tradisional, sederhana yang melibatkan proses perendaman simplisia dalam pelarut tertentu. Pelarut akan masuk ke dinding sel dan bagian rongga sel di dalamnya terdapat kandungan zat aktif. Zat aktif akan larut dan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan senyawa aktif di dalam dan diluar sel, maka senyawa aktif akan ditarik keluar sel. Keuntungan metode maserasi yaitu seperti cara pengerjaan dan alat yang digunakan sederhana serta mudah untuk diperoleh. Proses maserasi berlangsung selama tiga hari dan selama penyimpanan diletakkan di tempat yang terlindung dari sinar matahari. Pada proses ekstraksi perlu diaduk sesekali. Tujuan dilakukan pengadukan dalam maserasi ini yaitu untuk menjaga konsentrasi larutan yang terdapat di luar dan di dalam serbuk simplisia. Ekstraksi metode ini mempunyai

beberapa modifikasi, yaitu maserasi dengan menggunakan mesin pengaduk, maserasi melingkar, remaserasi, dan maserasi melingkar bertingkat (Najib, 2018).

2.5.2 Metode Ekstraksi Ultrasound Assisted Extraction (UAE)

Ultrasound-Assisted Extraction (UAE) adalah suatu metode ekstraksi yang mempunyai kelebihan seperti energi yang diperlukan rendah, volume pelarut yang digunakan sedikit. Pada beberapa tahun terakhir, UAE banyak digunakan untuk mengekstraksi berbagai alga, terutama polisakarida seperti karagenan dan alginat; pigmen termasuk fukosantin, klorofil, atau β -karoten; dan senyawa fenolik (Carreira-Casais *et al.*, 2021). Dalam metode ini, gelombang ultrasonik yang digunakan yaitu pada frekuensi antara 20 KHz dan 10 MHz, yang ditemukan diantara gelombang suara dan gelombang mikro. Rentang frekuensi 20-100 KHz biasanya digunakan untuk ekstraksi (Tiwari, 2015).

Prinsip UAE yaitu berdasarkan kavitasi akustik. Kavitasi akustik ini akan menyebabkan terjadinya erosi, fragmentasi (Tiwari, 2015). Selain itu, dapat menyebabkan efek sonokapiler, sonoporasi, tegangan geser lokal, dan deteksturasi (Chemat *et al.*, 2016; Khadhraoui *et al.*, 2017 ; Vinatoru *et al.*, 2017). Dengan efek kavitasi akustik dari ultrasonik akan meningkatkan kontak permukaan antara pelarut dengan sampel. Ketika hal tersebut terjadi, maka dinding sel dari tanaman atau sampel akan terganggu (Dhanani *et al.*, 2013).

2.6 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan senyawa dalam suatu ekstrak berdasarkan kepolarannya. Di dalam fraksinasi, terdapat dua pelarut yang digunakan. Pelarut tersebut tidak tercampurkan dan mempunyai tingkat kepolaran yang berbeda. Menurut Harbone (1987), metode fraksinasi merupakan acuan untuk menduga sifat kepolaran suatu senyawa target. Metode fraksinasi mempunyai kelebihan yaitu mampu memisahkan senyawa bioaktif berdasarkan tingkat kepolaran. Hal ini berprinsip pada *like dissolve like* yang mana jika senyawa target bersifat polar maka dapat larut di pelarut yang polar, jika sifat senyawanya semipolar maka larut dalam pelarut yang semipolar, dan jika senyawa bersifat non polar maka akan larut dalam pelarut non yang polar. Menurut Venn (2008), pelarut

yang digunakan untuk fraksinasi didasarkan pada sifat analitnya, sehingga pelarut dan analit harus mempunyai kesamaan dari segi sifatnya (Putri *et al.*, 2023).

Jenis metode fraksinasi yang umum digunakan adalah ekstraksi cair-cair (ECC) dan kromatografi. ECC adalah suatu teknik pemisahan yang didasarkan pada fenomena distribusi atau partisi analit diantara dua pelarut yang tidak dapat bercampur. Tujuan utama ECC adalah untuk menghasilkan senyawa dari campuran fasa cair dengan menggunakan pelarut lain yang fasa cair. Prinsip dasar dari ekstraksi ini adalah perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam dua pelarut yang berbeda (Leba, 2017).

Dalam pelaksanaan ECC, alat yang digunakan yaitu corong pemisah. Corong pemisah digunakan untuk memisahkan komponen dalam campuran antara dua fasa pelarut yang mempunyai berat jenis yang berbeda dan tidak dapat saling bercampur. Corong pemisah biasanya terbuat dari kaca borosilikat dengan sumbat di bagian atas dan kran di bagian bawah yang terbuat dari kaca atau teflon (Leba, 2017).

2.7 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Metode analisis kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode yang digunakan dalam memisahkan campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Prinsip kerja KLT berfokus pada adsorpsi senyawa oleh fasa gerak dan fasa diam. Pemisahan terjadi karena adanya tingkat polaritas yang berbeda dari senyawa di dalam campuran fasa diam dan fasa gerak. Tingkat polaritas yang berbeda dapat menyebabkan terjadinya suatu pemisahan yang dapat diamati dari bercak dan nilai R_f (*Retardation factor*) (Leba, 2017).

1. Fasa Diam

Fasa diam pada KLT yaitu berupa padatan yang diletakkan pada penyangga seperti kaca atau aluminium. Beberapa jenis adsorben yang digunakan yaitu (Rubiyanto, 2017):

a. Silika gel: asam-asam amino, alkaloid, dan asam lemak

Silika gel yang banyak terdapat di pasaran, yaitu:

- 1) Silika gel G: mengandung 13% CaSO_4
- 2) Silika gel H: tidak mengandung CaSO_4

- 3) Silika gel PF: mengandung bahan fluoresensi
- b. Alumina: alkaloid, zat warna, dan fenol
- c. Kielsghur: glukosa, oligosakarida, dan trigliserida
- d. Selulosa: asam amino dan alkaloid.

2. Fasa Gerak

Parameter yang dapat dilihat ketika akan pemilihan fase gerak yaitu kelarutan (*solubility*), indeks polaritas (*polarity index*), dan kekuatannya sebagai *solvent*. Sifat fasa gerak yang ideal yaitu sebagai berikut (Rubiyanto, 2017):

- a. Tingkat kemurniannya tinggi dan harga terjangkau
- b. Tidak menghasilkan reaksi dengan komponen dalam sampel dan fasa diam
- c. Mempunyai tingkat kekentalan dan tegangan permukaan yang sesuai
- d. Titik didih yang relatif rendah
- e. Kelarutan yang ideal pada berbagai pelarut
- f. Tidak toksik

3. Visualisasi

Visualisasi merupakan suatu proses untuk memperlihatkan noda yang terbentuk dari proses pengembangan. Beberapa cara visualisasi yaitu sebagai berikut (Rubiyanto, 2017):

a. Uap Iodium

Plat yang sudah kering diletakkan di wadah yang berisi iodium, uap iodium yang mengenai plat yang mengandung senyawa terpisah akan membentuk spot/ bercak coklat dengan dasar hitam.

b. Sinar Ultraviolet

Sinar ultraviolet akan memberikan efek fluoresensi pada plat yang mengandung fluor sehingga noda akan terlihat

c. Penyemprotan

Penyemprotan dapat dilakukan dengan menggunakan larutan $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dan dipanaskan pada suhu 125°C .

4. Identifikasi

Proses identifikasi ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa dari gugus fungsi tertentu. Dalam proses identifikasi digunakan pereaksi kimia. Beberapa contoh pereaksi tersebut antara lain (Rubiyanto, 2017):

- a. Larutan ninhidrin: mengidentifikasi gugus fungsi asam amino, yang ditandai dengan terbentuknya bercak/ noda berwarna kuning hingga jingga.
- b. Anilin ftalat: mengidentifikasi gula-gula pereduksi.
- c. Anisaldehyd dalam H_2SO_4 dan CH_3COOH : mengidentifikasi karbohidrat, hasil positifnya ditandai dengan warna biru.
- d. Antimon klorida dalam CHCl_3 : mengidentifikasi steroid, steroid glikosida, lipida alifatik, vitamin A.
- e. 2,4 dinitro-fenil hidrazin: mengidentifikasi gugus aldehyd dan keton.
- f. Ferriklorida: mengidentifikasi gugus fenol.
- g. Fluoresein Br_2 : mengidentifikasi senyawa organik tidak jenuh.
- h. Bromokresol hijau: mengidentifikasi asam karboksilat.

5. Penentuan nilai R_f (*Retardation factor*)

Rasio dari nilai R_f yaitu perbandingan antara jarak yang ditempuh oleh senyawa/ bercak yang digerakkan oleh pelarut dari titik awal terhadap jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal (Rubiyanto, 2017). Nilai R_f dapat dihitung menggunakan rumus:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

2.8 Radikal Bebas

Berdasarkan Halliwell pada tahun 1999, radikal bebas merupakan atom, gugus, molekul, atau senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital paling luar. Molekul tersebut diantaranya atom hidrogen, logam transisi, dan molekul oksigen. Adanya satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan dapat menyebabkan molekul ini cenderung tertarik pada suatu medan magnetik dan memberikan sifat molekul yang sangat reaktif. Radikal bebas dihasilkan dari proses yang dilakukan oleh enzim oksidase yaitu hidrogen peroksida

(H_2O_2), ion superoksida (O_2^-), radikal peroksil ($\text{OOH}^\bullet$), radikal peroksil ($\text{OH}^\bullet$), dan oksigen singlet (Yuslianti, 2018).

1. Sumber Radikal Bebas

a. Radikal bebas bersumber dari dalam tubuh (endogeneus)

Sumber dari dalam tubuh dapat melewati autoksidasi, oksidasi enzimatis, fagositosis dalam respirasi, transpor elektron di mitokondria, oksidasi ion-logam transisi, atau melalui iskemik (Yuslianti, 2018).

b. Radikal bebas bersumber dari luar tubuh (eksogeneus)

Sumber radikal bebas yang berasal dari luar tubuh yaitu sinar UV, radiasi, asap rokok, senyawa kimia karbontetraklorida, senyawa hasil pemanggangan, dan zat warna (Yuslianti, 2018).

2. Klasifikasi radikal bebas

Berdasarkan sifat reaktivitasnya, senyawa radikal bebas dapat diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu:

a. Senyawa yang bersifat radikal, yaitu ROS (*Reactive Oxygen Species*)

ROS adalah radikal bebas oksigen, molekul dengan elektron tak berpasangan yang memiliki tingkat reaktivitas tinggi. Radikal bebas ini mempunyai potensi sebagai penyebab dari kerusakan membran sel. ROS berperan dalam berbagai penyakit pada manusia seperti penuaan kulit, kanker, serangan jantung, stroke, dan radang sendi. Senyawa radikal yang termasuk dalam kategori ini meliputi radikal hidroksil ($\text{OH}^\bullet$), radikal superoksida (O_2^-), radikal peroksil ($\text{-COOH}^\bullet$), radikal alkoksil ($\text{RO}^\bullet$), dan radikal nitrogen oksida ($\text{NO}^\bullet$) (Yuslianti, 2018).

b. Senyawa bersifat non radikal

Senyawa yang bersifat non radikal terdiri dari hidrogen peroksida, singlet oksigen, oksida nitrit, peroksinitrit, nitrogen dioksida ($\text{NO}_2^\bullet$), ozon (O_3), dan asam hipoklorit (HOCl) (Yuslianti, 2018).

3. Manfaat dan dampak dari radikal bebas

Jika jumlah radikal bebas dalam tubuh terdapat pada batas normal, maka dapat memberikan manfaat positif bagi kesehatan. Manfaatnya yaitu dapat membunuh bakteri, mengontrol otot polos pembuluh darah, dan mengatur

fungsi dari organ dalam tubuh. Namun, ketika jumlah radikal bebas dalam tubuh melebihi batas normal, dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif adalah suatu kondisi yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh. Hal ini dapat menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan, kanker, gangguan fungsi homeostasis ion, gangguan aktivitas enzim, dan merusak dan mematikan sel (Yuslianti, 2018).

2.9 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mempunyai kemampuan untuk menghambat, memperlambat, serta mencegah oksidasi lemak. Dilihat dari sumber/asalnya, antioksidan dikelompokkan menjadi dua kategori, yaitu antioksidan enzimatik dan antioksidan non-enzimatik. Antioksidan enzimatik merupakan jenis antioksidan yang dihasilkan secara endogen di dalam tubuh, yang diproduksi melalui enzim seperti enzim superoksida dismutase, glutathione peroksidase, peroksidase, dan katalase. Sementara itu, antioksidan non-enzimatik dapat berasal dari lingkungan sekitar (antioksidan alami) dan dihasilkan dari reaksi kimia sintetik (dikenal dengan antioksidan sintetik). Antioksidan alami dapat diperoleh melalui ekstraksi dari tanaman, hewan, mineral, sediaan galenik, serta campuran dari zat-zat tersebut (Yuslianti, 2018).

Senyawa antioksidan yang bersumber dari tanaman dapat dihasilkan dari bagian kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji, dan serbuk sari. Efek antioksidan pada tanaman disebabkan karena keberadaan senyawa fenolik atau polifenol berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional. Senyawa antioksidan alami polifenol memiliki sifat yang multifungsi, yang berfungsi sebagai zat pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkhelat logam, serta mengurangi pembentukan singlet oksigen (Yuslianti, 2018).

Klasifikasi antioksidan tidak hanya berdasarkan sumbernya, melainkan ada juga berdasarkan fungsinya. Antioksidan berdasarkan fungsinya diklasifikasikan

menjadi tiga kategori, yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier (Yuslianti, 2018).

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer berfungsi untuk mencegah terbentuknya radikal bebas baru karena antioksidan ini dapat mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang lebih stabil sebelum bereaksi membentuk radikal bebas baru. Contohnya yaitu superoksida dismutase, *glutathione* peroksidase, katalase, peroksidase, dan albumin pengikat logam.

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder adalah senyawa yang memiliki peran dalam menangkap radikal bebas dan mencegah jalannya reaksi berantai untuk menghindari terjadinya kerusakan yang lebih lanjut. Contoh antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, vitamin A, dan β -karoten.

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier merupakan antioksidan yang memiliki fungsi dalam memperbaiki sel serta jaringan yang mengalami kerusakan akibat serangan radikal bebas. Salah satu contoh antioksidan tersier adalah metionin sulfoksida reduktase.

2.10 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dapat menggunakan berbagai metode seperti:

1. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*)

Metode ORAC menggambarkan kemampuan antioksidan dalam menghasilkan atom hidrogen. Metode ini dilakukan melalui pemantauan penghambatan oksidasi radikal peroksil. Radikal peroksil ini mempunyai ciri sebagai radikal bebas yang mendominasi oksidasi lipid dan juga terdapat pada bahan makanan. Sebagai antioksidan standar yang digunakan yaitu trolox (Munteanu & Apetrei, 2021).

2. Metode HORAC (*Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*)

Metode ini dapat menilai kemampuan proteksi terhadap pembentukan radikal hidroksil melalui kompleks Co (II). Fluorescein akan diinkubasi dengan

sampel, dan ditambahkan campuran fenton sebagai penghasil radikal hidroksil. Fluoresensi diukur dan dilakukan pengukuran setiap menit setelah dilakukan pengadukan. Pada metode ini, larutan baku standar yang digunakan adalah asam galat dengan beberapa variasi konsentrasi (Munteanu & Apetrei, 2021).

3. Metode TRAP (*Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter*)

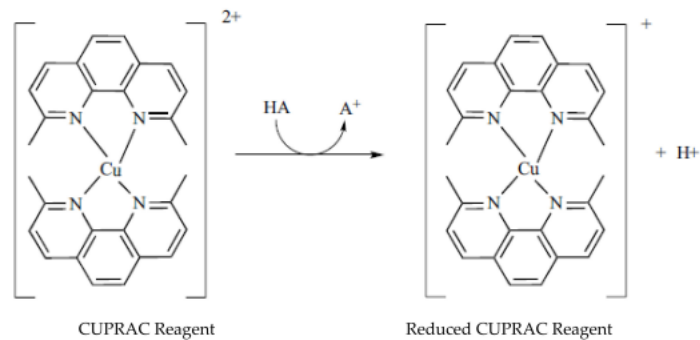
Metode ini berdasarkan kapasitas antioksidan di dalam menghambat reaksi radikal peroksil dengan molekul target. Waktu retardasi O_2 , yaitu periode induksi dapat diukur secara kuantitatif dan digunakan untuk menyatakan kapasitas antioksidan total sampel sebagai nilai TRAP (Munteanu & Apetrei, 2021).

4. Metode TOSC (*Total Oxyradical Scavenging Capacity*)

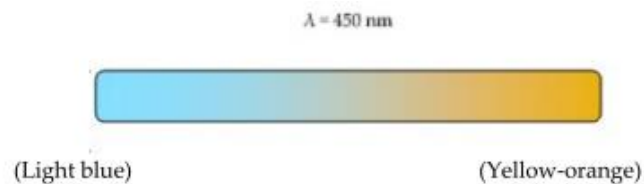
Prinsip dari metode ini yaitu menghambat produksi etilen dengan menggunakan senyawa antioksidan yang bersaing dengan asam KMBA (α -keto- γ -bethiolbutiric acid) untuk ROS. Pengujian ini menggunakan area di bawah kurva konsentrasi etilen yang dibandingkan dengan waktu bereaksi (sampai 300 menit) (Munteanu & Apetrei, 2021).

5. Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Metode ini didasarkan pada reduksi tembaga (Cu^{2+}) menjadi (Cu^+). Ligan yang digunakan untuk membentuk kompleks tembaga-ligan yaitu Neocuproin (Nc; 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline). Terjadinya reduksi dari Cu^{2+} menjadi Cu^+ karena adanya *neocuproine* dengan puncak serapan maksimum pada 450 nm. pH yang digunakan yaitu pada pH 7,0. Dalam metode ini, kelompok Ar-OH reaktif polifenol dan antioksidan lainnya akan dioksidasi menjadi kuinon dan Cu^{2+} - *neocuproine* direduksi menjadi kompleks Cu^+ yang berwarna kuning-orange. Jadi dapat dikatakan bahwa dengan metode CUPRAC, warna berubah dari biru muda menjadi kuning-orange (Munteanu & Apetrei, 2021).



Gambar 2. 2 Reaksi CUPRAC (Sumber: Monteanu & Apetrei, 2021)



Gambar 2. 3 Perubahan Warna Dalam Pengujian Metode CUPRAC (Sumber: Monteanu & Apetrei, 2021)

Keuntungan dari metode CUPRAC yaitu sebagai berikut (Munteanu & Apetrei, 2021):

- a. Pereaksi CUPRAC bersifat selektif, karena memiliki potensi redoks yang lebih rendah dibandingkan pasangan besi karena dengan adanya fenantrolin. Potensial standar dari pasangan redoks Cu (II,I)-Nc yaitu berkisar antara 0,2-0,6 Volt.
- b. Pereaksi CUPRAC mempunyai sifat lebih stabil dan mudah didapatkan dibandingkan dengan reagen kromogenik.
- c. Mampu mengukur antioksidan hidrofilik dan lipofilik (seperti β -karoten, α -tokoferol).
- d. Lebih tahan terhadap udara, kelembaban, dan sinar matahari tidak mempengaruhi reaksi CUPRAC dengan antioksidan.
- e. Pereaksi CUPRAC cukup cepat untuk mengoksidasi antioksidan tipe tiol. Adanya struktur Cu(II) yang memungkinkan terjadinya kinetika cepat.
- f. Metode ini mudah dilakukan di laboratorium konvensional menggunakan kolorimeter standar.

6. Metode FRAP (*Ferric Antioxidant Power*)

Metode FRAP mengukur reduksi kompleks ion besi (Fe^{3+}) menjadi Fe^{2+} . Aktivitas antioksidan ditentukan sebagai peningkatan serapan pada panjang gelombang 593 nm. Metode uji FRAP dilakukan pada kondisi asam ($\text{pH} = 3,6$) untuk menjaga kelarutan besi. Metode uji FRAP digunakan untuk mendeteksi kontaminasi air, mempelajari pengaruh radiasi, polusi, perubahan iklim (Munteanu & Apetrei, 2021).

7. Metode ABTS (2,20 -Azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

Metode ABTS dilakukan dengan berdasarkan pada penghapusan kromofor stabil seperti (2,20 -azinobis(3- ethylbenzthiazolin-6-sulfonic acid) katin radikal stabil. Warna berubah menjadi biru-hijau, diukur dengan panjang gelombang 734 nm, tergantung dari durasi reaksi, aktivitas antioksidan intrinsik, dan konsentrasi sampel. Metode ini dilakukan untuk mengukur kapasitas antioksidan total zat murni, cairan tubuh, dan bahan nabati (Munteanu & Apetrei, 2021).

8. Metode DPPH [2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl]

Metode uji DPPH adalah suatu teknik yang mudah dalam proses pengerjaannya, hanya memerlukan spektrofotometer UV-Vis atau spektrofotometer resonansi paramagnetik elektronik (EPR). Penerapan metode DPPH ini dapat digunakan untuk mengukur kandungan antioksidan pada senyawa fenolik. Metode DPPH ini mempunyai kelebihan seperti biaya penggunaannya cukup rendah (Munteanu & Apetrei, 2021).

2.11 Fenol

Senyawa fenolat merupakan metabolit sekunder yang terdistribusi secara luas pada tanaman. Secara struktural, senyawa fenolat mencakup senyawa yang mempunyai cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dapat bervariasi mulai dari fenol sederhana hingga kompleks. Senyawa fenolat dibagi menjadi subkelompok asam fenolat, flavonoid, tanin, stilben berdasarkan jumlah gugus fenolik hidroksil yang melekat dan elemen struktural yang menghubungkan cincin benzennya. Senyawa fenolat mempunyai fungsi biologis seperti

perlindungan terhadap stres oksidatif dan juga penyakit degeneratif (Diniyah & Lee, 2020).

2.12 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometri merupakan teknik analisis yang bergantung pada interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan spesies kimia (zat). Interaksi dapat terjadi melalui penyerapan, luminense, emisi, hamburan, tergantung pada sifat zatnya. Berdasarkan interaksi tersebut, alat yang digunakan untuk mengetahui informasi tentang spesies kimia yang akan dianalisis secara kualitatif atau kuantitatif dapat menggunakan spektrofotometer. Spektrofotometer terdiri dari spektrofotometer sinar tampak, spektrofotometer IR, spektrofotometer ultraviolet (Khaldun, 2018).

Spektrofotometer UV-Vis digunakan untuk melakukan analisis, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Proses yang dilakukan dalam analisis kualitatif yaitu (Harmita, 2014):

1. Membandingkan panjang gelombang maksimum (λ_{maks})
2. Membandingkan serapan (A), daya serap (a), dan $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$
3. Membandingkan spektrum serapan

Analisis kuantitatif suatu sampel menggunakan spektrofotometri dapat dilakukan dengan cara (Khaldun, 2018):

1. Memilih kuvet yang sesuai
2. Menentukan λ_{maks}

Penting untuk dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum (λ_{maks}). Hal ini karena pada panjang gelombang maksimum terjadi penyerapan cahaya secara optimal. Pengukuran yang dilakukan pada panjang gelombang maksimum akan menghasilkan konsentrasi yang sebenarnya mengikuti kurva garis lurus.

3. Menentukan faktor yang mempengaruhi pembacaan absorbansi

Faktor-faktor yang dapat mempengaruhi absorbansi, yaitu:

a. Pemilihan pelarut

Pelarut yang akan digunakan dalam analisis kuantitatif harus memiliki tingkat kemurnian yang tinggi, tanpa mengandung ikatan rangkap yang terkonjugasi dalam struktur molekulnya, bebas dari warna, serta tidak berinteraksi dengan molekul senyawa yang sedang disintesis. Beberapa contoh pelarut yang umum digunakan meliputi air, metanol, sikloheksana, heksana, dietil eter, p-dioksan, etanol, kloroform, karbon tetraklorida, benzena, toluena, piridin, aseton, dan karbon disulfida.

b. Pemilihan pH optimum

Kestabilan kompleks ligan dengan logam dipengaruhi oleh pH. Untuk mempertahankan kestabilannya maka biasanya dapat menggunakan larutan penyangga.

c. Suhu

Suhu bisa mempengaruhi absorptivitas molar.

d. Pereaksi warna

Pereaksi warna biasanya diperlukan untuk analisis khusus di daerah sinar tampak, karena pada umumnya ion logam dalam jumlah kecil di larutan air tidak berwarna.

e. Pengaruh ion penyangga

Pengaruh ion pengganggu yang dapat ditoleransi jika kesalahan pembacaan absorbansi $<5\%$ atau terjadi kesalahan konsentrasi kecil dari 3% .

4. Membuat kurva kalibrasi

Kurva kalibrasi adalah suatu garis yang diperoleh dari analisis regresi linier dari titik-titik yang mewakili konsentrasi serapan. Kurva kalibrasi ini digunakan untuk memastikan bahwa komposisi larutan sampel sesuai dengan larutan standar.

5. Menentukan konsentrasi sampel.