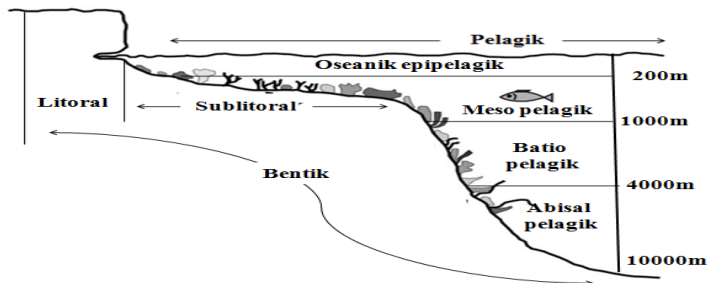


BAB II Tinjauan Pustaka

II.1 Mikroalga

Mikroalga adalah organisme tumbuhan paling primitif yang berukuran renik dan dikenal dengan nama fitoplankton. Habitat hidupnya adalah wilayah perairan, baik air tawar maupun air laut, atau di tempat-tempat lembab. Secara morfologi, mikroalga termasuk ke dalam eukariot meskipun sebagian kecil merupakan prokariot. Masa pertumbuhan mikroalga cukup singkat, yaitu pada kisaran 7 – 10 hari, dan bereproduksi secara seksual maupun aseksual, bergantung pada kondisi lingkungannya. Mikroorganisme ini dapat berupa planktonik, yaitu hidup di zona pelagik dan mengikuti arus air, serta ada pula yang bentik, yaitu hidup di dasar perairan, menempel pada bebatuan (epilitik), pasir atau lumpur (epipelik), tanaman (epipitik) atau pada hewan (epizoik) (Barsanti & Gualteri, 2006). Habitat mikroalga pada zona perairan dapat dilihat pada gambar II.1.



Gambar II.1. Habitat Mikroalga

Sumber: http://id.wikipedia.org/wiki/Berkas:Zona_laut.jpg, (diakses pada oktober 2019).

Mikroalga merupakan sumber biomasa yang mengandung komponen-komponen bermanfaat tinggi seperti protein, karbohidrat, asam lemak, lipid dan pigmen. Didasarkan pada perkembangan bioteknologi saat ini serta biodiversitas mikroalga yang tinggi, mikroalga dapat dikembangkan menjadi bahan baku berbagai produk baru yang dapat diaplikasikan di berbagai bidang termasuk industri pangan dan pakan, *fine chemical*, energi dan farmasi. Penggunaan mikroalga di bidang industri pangan dimanfaatkan sebagai zat pewarna alami, seperti mikroalga *Spirulina* sp. yang dimanfaatkan sebagai penghasil pigmen biru fikosianin (Vhonshak, 2002).

Di bidang energi, produk biodiesel dan bioetanol dari mikroalga *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. dan *Schizochytrium* sp. terus dikembangkan (Li dkk., 2008) dikarenakan memiliki kandungan lipid dan karbohidrat yang tinggi. Di bidang farmasi, pembuatan suplemen kesehatan memanfaatkan mikroalga *Dunaliella* sp. dan *Chlorella* sp. dimanfaatkan sebagai penghasil antibiotik.

II.1.1 Klasifikasi Mikroalga

Mikroalga yang banyak ditemukan dari kelas *Bacillariopiceae* (diatom), *Chrysophyceae* (alga coklat keemasan), *Chlorophyceae* (alga hijau) dan kelas *Cyanophyceae* (*blue green algae*/alga biru-hijau) (Kawaroe dkk., 2010).

Menurut Kawaroe dkk (2010), mikroalga diklasifikasikan berdasarkan pigmen, yaitu :

1. *Chlorophyta* (alga hijau)

Alga ini merupakan kelompok alga yang paling beragam karena ada yang bersel tunggal dan berkoloni. Pigmen

yang dimilikinya adalah klorofil (klorofil *a* dan *b*) yang mengandung karoten.

2. *Chrysopyta* (alga keemasan)

Alga ini digolongkan dalam 3 kelas yaitu alga hijau-kuning (*xanthophyceae*), alga kuning keemasan (*chrysophyceae*) dan diatom (*bacillaryophyceae*). Alga hijau-kuning (*xanthophyceae*) memiliki dua pigmen yaitu klorofil *a* dan *c* (pigmen hijau) dan xantofil (pigmen kuning). Alga kuning keemasan (*chrysophyceae*) memiliki dua pigmen yaitu flukosianin (keemasan) dan klorofil (*a* dan *c*). Diatom (*bacillaryophyceae*) dinding selnya berisi silika dan jenis bahan organik yang memproduksi minyak *chrysolaminaran*, diatom memiliki berbagai pigmen klorofil termasuk karotenoid serta diatomin.

3. *Pyrrophyta* (alga api)

Alga yang termasuk kedalam golongan alga api adalah *Dinoflagellata*, yaitu tubuh tersusun atas satu sel yang memiliki dinding sel dan dapat bergerak aktif.

Alga api yang hidup di laut memiliki sifat fosforesensi, yaitu memiliki fosfor yang memancarkan cahaya.

Pigmen yang dimilikinya yaitu klorofil *a* dan *c*, betakaroten, xantofil dan thylakoid. *Euglenophyta*

Euglenophyta adalah organisme bersel satu, tidak berdinding sel dan mempunyai alat gerak berupa flagel.

Pigmen yang dimilikinya yaitu klorofil *a* dan *c*, fukosantin, betakaroten xantofil dan thylakoid.

4. *Chlorophyta* (alga hijau-biru)

Alga ini memiliki kombinasi klorofil *a* dan *c* berwarna hijau dan fikosianin berwarna biru. Adanya kombinasi dari klorofil, karotenoid, fikosianin, dan fikoeritrin dalam jumlah yang berbeda-beda di dalam tubuh mikroalga ini, akan memunculkan aneka warna seperti merah, hijau terang, coklat, ungu bahkan hitam.

II.1.2 *Thalassiosira* sp

Mikroalga laut *Thalassiosira* sp. merupakan mikroalga dari kelas Bacillariophyceae (diatom). Diatom memiliki kerangka yang tersusun dari silika dan memproduksi minyak yang disimpan dalam sel. Diatom dapat mengatur daya apungnya dalam air dengan memvariasikan kandungan minyak (Wolkers dkk., 2011). Sebagian diatom tidak hidup sebagai organisme planktonik melainkan benthik.

Diatom *Thalassiosira* sp. memiliki taksonomi sebagai berikut (Botes, 2001):

Divisi : Bacillariophyta
 Orde : Biddulphiales
 Sub-orde : Coscinodiscinaea
 Famili : Thalassiosiraceae
 Genus : *Thalassiosira*
 Spesies : *Thalassiosira* sp.



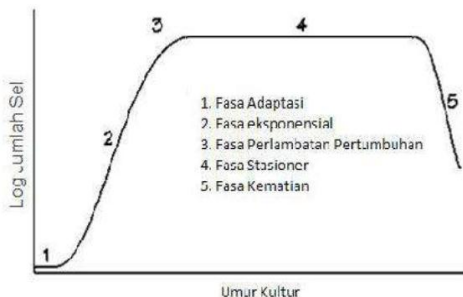
Gambar II.2 Bentuk sel *Thalassiosira* sp.

Sel *Thalassiosira* sp. berbentuk segi empat yang disatukan dengan rantai fleksibel berupa benang sitoplasmik atau gelatin.

Mikroalga *Thalassiosira* sp. berwarna coklat kekuningan dengan diameter sel rata-rata 10 μm (Nurachman dkk., 2012).

II.1.3 Fase Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga melalui lima fasa, yaitu fasa adaptasi, eksponensial, perlambatan pertumbuhan, stasioner dan kematian. Kelima fasa pertumbuhan mikroalga tersebut memiliki pola seperti yang ditunjukkan pada Gambar II.3.



(Sumber: Lavens dan Sorgeloos, 1996)

Gambar II.3 Kurva Pertumbuhan Mikroalga

1. Fasa adaptasi merupakan fasa awal pertumbuhan mikroalga ketika ukuran sel meningkat tetapi kepadatan sel belum bertambah. Pada fasa ini juga mikroalga melakukan penyesuaian sistem metabolisme pertumbuhan dan melakukan penyesuaian dengan medium serta mulai menyerap nutrisi di dalamnya (Lavens & Sorgeloos, 1996)
2. Fasa eksponensial merupakan fasa pertumbuhan ketika terjadi pembelahan sel yang sangat cepat, sehingga pertumbuhan mikroalga mengalami peningkatan yang signifikan dibanding fasa sebelumnya. Hal ini ditandai dengan kepadatan sel yang tinggi dan perubahan warna kultur menjadi lebih pekat. Pada fasa ini, kondisi nutrisi, pH, CO₂ dan mikroalga sangat baik (Barsanti & Gualteri, 2006).
3. Fasa perlambatan pertumbuhan terjadi penurunan pertumbuhan dikarenakan kuantitas nutrisi, pH, CO₂ dan faktor fisika-kimia pertumbuhan berada di bawah batas normal, sehingga laju replikasi mulai menurun dibandingkan dengan fasa sebelumnya (Barsanti & Gualteri, 2006).
4. Fasa stasioner, jumlah sel replikasi dengan jumlah sel kematian sebanding. Hal ini disebabkan oleh nutrisi dalam media kultur tak lagi mendukung mikroalga untuk melakukan pembelahan sel. Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan stasioner pada kultur diatom dapat disebabkan oleh penurunan intensitas cahaya yang diakibatkan oleh *self-shading* (ketika tingginya kepadatan sel menyebabkan penetrasi cahaya terhalang oleh bayangannya sendiri)(Lavens & Sorgeloos, 1996).

5. Fasa kematian, rendahnya nutrisi dan tingginya jumlah sel mikroalga mati yang melepaskan metabolit sekunder dapat menghambat pertumbuhan sel. Pada fasa ini, kontaminasi dapat terjadi karena mikroorganisme lain yang tumbuh dengan memanfaatkan keberadaan metabolit sekunder (Barsanti & Gualteri, 2006).

II.1.4 Faktor-faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga

Dalam mengultivasi mikroalga, keberhasilannya sangat dipengaruhi oleh beberapa parameter kondisi fisika-kimia yang memadai antara lain :

- a. **Pencahayaan**, cahaya merupakan sumber energi untuk menjalankan reaksi fotosintesis, asimilasi karbon anorganik menjadi materi organik. Pengaturan intensitas dan fotoperiode merupakan hal yang penting dalam kultivasi mikroalga (Coutteau, 2007).
- b. **pH**, perbedaan pH dapat mempengaruhi pertumbuhan alga, karena ia dapat mengubah distribusi karbondioksida, materi organik hasil fotosintesis, serta logam dan nutrisi penting. Bahkan pada kondisi ekstrim, pH dapat menyebabkan efek psikologis pada pertumbuhan alga dan mengganggu berbagai proses seluler (Coutteau, 2007).
- c. **Suhu**, suhu yang diperlukan dalam kultur alga berkisar antara 18-24°C bergantung pada komposisi medium serta jenis dan galur dari alga (Coutteau, 2007). Suhu lebih rendah dari rentang

tersebut akan memperlambat pertumbuhan, sementara jika suhu lebih tinggi dapat menyebabkan kematian alga.

d. Salinitas, mikroorganisme laut umumnya sangat toleran terhadap perubahan salinitas, sebagian besar spesies justru memiliki pertumbuhan optimum pada salinitas yang sedikit lebih rendah dari habitat asli mereka. Kenaikan salinitas umumnya dapat meningkatkan kadar lipid, namun tidak mempengaruhi kadar karotenoid (Cifuentes dkk., 2001).

e. Nutrisi, unsur penting yang dibutuhkan dalam pertumbuhan mikroalga adalah nitrogen, fosfor, silikat, dan mikronutrien seperti besi, biotin, vitamin B₁, dan vitamin B₁₂ (Coutteau, 2007). Nitrogen merupakan unsur esensial penyusun seluruh protein struktural dan fungsional dalam sel mikroalga (Stryer dkk., 2002). Fosfor merupakan makronutrien lain yang berperan dalam proses metabolisme sel dengan membentuk komponen struktural dan fungsional untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroalga (Richmond, 2004).

Sementara itu, silikat secara spesifik digunakan dalam pertumbuhan mikroalga diatom untuk memproduksi kerangka luar. Diantara mineral esensial, besi memiliki peranan penting dalam komposisi biokimia seluler karena sifat redoks dan implikasinya dalam proses fundamental, seperti fotosintesis, respirasi, fiksasi nitrogen, serta sintesis DNA (Richmond, 2004).

f. Aerasi/pencampuran, dilakukan untuk mencegah sedimentasi alga dan memastikan seluruh sel dalam kultur mendapatkan

jumlah cahaya dan nutrisi yang sama. Hal ini dilakukan untuk mencegah statifikasi termal dan meningkatkan pertukaran gas antara medium kultur dan udara (Coutteau, 2007). Mikroalga memiliki rentang nilai toleransi bagi tiap parameter untuk tetap bertahan hidup, seperti yang ditunjukkan pada Tabel II.1.

Tabel II.1. Parameter kondisi fisika-kimia untuk pertumbuhan mikroalga

Parameter	Rentang Toleransi	Optimum bergantung pada jenis mikroalga)
Ph	7 – 9	8,2 - 8,7
Suhu (C)	16 – 27	1 – 24
Salinitas (g/L)	12 – 40	20 – 40
Intensitas sinar (lux)	1000 -10.000 (bergantung kepadatan sel)	2.500 – 5000
Fotoperiode (gelap :terang, jam)	-	8 :16 (minimum) 24 : 0 (maksimum)

Sumber: Lavens & Sorgeloos (1996).

II.1.5 Teknik Kultur Mikroalga

Mikroalga dapat dikultur dalam sistem terbuka, misalnya pada kolam atau tambak, ataupun dalam sistem tertutup, misalnya menggunakan fotobioreaktor. Teknik pengkulturannya sendiri terdiri dari tiga jenis, yaitu teknik Batch, teknik berkesinambungan (*continue*), dan teknik semi-berkesinambungan (*semicontinue*).

Teknik kultur Batch dilakukan dengan menginokulasi sel tunggal dan mengkultivasinya dalam kolam atau reaktor dengan periode pertumbuhan tertentu dan dipanen ketika kepadatan mikroalga mencapai maksimum. Sistem kultur Batch diterapkan secara luas karena sederhana dan fleksibel. Namun dalam skala besar, metode ini kurang efisien karena setelah dipanen, kolam harus dibersihkan dan dibutuhkan banyak medium (air tawar atau laut) serta inokulum mikroalga yang baru untuk kultivasi selanjutnya (Barsanti dan Gualteri, 2006).

Teknik kultur berkesinambungan prinsipnya adalah penambahan nutrisi diberikan secara berkelanjutan yang disertai dengan pemanenan kultur. Tujuan dari perlakuan ini agar kultur mencapai laju pertumbuhan maksimum, karena kebutuhan nutrisi selalu terpenuhi setiap waktu. Kelemahan dari teknik ini adalah pengelolaannya yang relatif mahal, sehingga sistem ini hanya diterapkan dalam skala kecil. Namun, kualitas mikroalga lebih terjamin dibandingkan dengan teknik kultur Batch (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

Teknik kultur semi-berkesinambungan dilakukan dengan memperpanjang penggunaan kultur dengan pemanen secara parsial dan berperiode, kemudian diikuti dengan penambahan nutrisi dan medium (air tawar atau laut) hingga mencapai volume awal kultur. Kekurangan dari teknik ini adalah umur kultur tidak dapat diprediksi, rentan kontaminan, dan penurunan kualitas kultur apabila dibudidayakan dalam jangka waktu panjang (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

II.1.6 Pemanenan Mikroalga

Pemilihan teknik pemanenan untuk memperoleh biomassa mikroalga harus disesuaikan dengan jenis dan kuantitas kultur (skala kecil atau besar). Teknik pemanenan yang biasa dilakukan adalah flokulasi, filtrasi, dan sentrifugasi.

Flokulasi merupakan teknik pemanenan dengan cara membuat agregat dari sel mikroalga dengan menambahkan flokulan, sehingga sel mikroalga mengendap dan lebih mudah untuk dikumpulkan. Senyawa flokulan yang biasa digunakan adalah natrium hidroksida (NaOH) atau alum ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$). Metode ini cocok diterapkan pada kultur berskala besar karena praktis dan relatif murah dibandingkan dengan menggunakan membran filtrasi (Andersen, 2005).

Teknik filtrasi dilakukan dengan cara mengalirkan atau menghisap kultur sel mikroalga ke membran filtrasi agar sel mikroalga dapat tertahan dan lebih mudah dikumpulkan. Sebelum dilakukan proses filtrasi, kultur sel mikroalga lebih baik didiamkan terlebih dahulu agar mengendap, sehingga proses filtrasi dapat dilakukan dengan volume kultur yang lebih sedikit. Teknik ini dapat diterapkan untuk kultivasi skala kecil dan besar, namun memerlukan biaya yang lebih besar untuk membran filternya (Barsanti dan Gualteri, 2006).

Teknik sentrifugasi merupakan proses pemanenan dengan memanfaatkan gaya sentrifugal dan gravitasi, sehingga sel mikroalga dapat terpisah dari mediumnya lalu mengendap (Barsanti dan Gualteri, 2006). Teknik ini lebih sering digunakan karena relatif

murah, lebih efisien, dan tidak memerlukan bahan kimia dalam prosesnya sehingga lebih aman.

II.2 Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga reaksi radikal bebas tersebut dapat terhambat. Antioksidan juga dapat diartikan sebagai bahan atau senyawa yang dapat menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi pada substrat atau bahan yang dapat teroksidasi. Senyawa ini memiliki berat molekul yang kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi dengan cara mencegah terbentuknya radikal.

Berkaitan dengan reaksinya di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara berlanjut dibentuk sendiri oleh tubuh. Jika jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut dengan *stress* oksidatif (Winarsi, 2007).

II.2.1 Mekanisme Kerja Antioksidan

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu :

a. Antioksidan primer (Antioksidan Endogenus)

Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksida (GSH-Px). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer apabila dapat

memberikan atom hydrogen secara tepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil.

b. Antioksidan Sekunder (Antioksidan Eksogenus)

Antioksidan sekunder meliputi vitamin E, vitamin C, karoten, Flavonoid, asam urat, bilirubin, dan albumin. Antioksidan sekunder ini disebut juga antioksidan eksogenus atau non enzimatis.

Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas, kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya.

c. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier meliputi system enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Senyawa kimia yang tergolong dalam kelompok antioksidan dan dapat ditemukan pada tanaman, antara lain berasal dari golongan polifenol, bioflavonoid, vitamin C, vitamin E, betakaroten, katekin, dan resveratrol.

II.2.2 Sumber Antioksidan

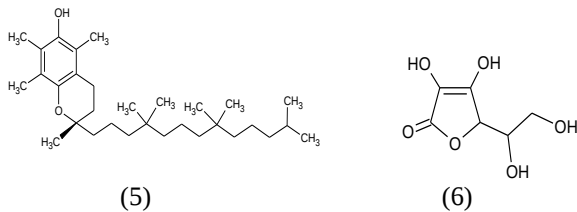
Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintesis dan antioksidan alami.

a. Antioksidan alami

Antioksidan ini diperoleh dari hasil ekstrak bahan alami. Kebanyakan senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami berasal dari tumbuhan. Isolasi antioksidan alami telah

dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, yaitu pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari.

Bahan-bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, yaitu rempah-rempah, dedaunan, teh, kakao, biji-bijian, sereal, buah-buahan, sayur-sayuran dan tumbuhan (mikroalga laut). Contoh dari antioksidan alami adalah β -karoten (Gambar 2.8.(4)), asam askorbat dan α -tokoferol (Gambar II.3) (Pratt & Hudson, 1990).



Gambar II.4 Struktur (5) α -tokoferol dan (6) Asam Askorbat
Struktur digambar menggunakan aplikasi Chems sketch

Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik. Senyawa antioksidan alami polifenolik adalah multifungsional dan dapat bereaksi sebagai (a) pereduksi, (b) penangkap radikal bebas, (c) pengkelat logam dan (d) peredam terbentuknya singlet oksigen.

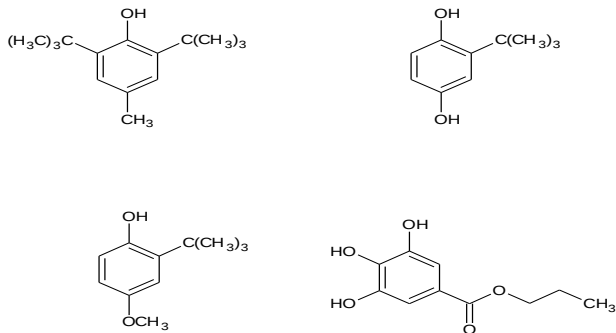
Senyawa fenolik mencakup sejumlah senyawa yang umumnya mempunyai sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil (OH), karboksil (COOH), metilenil (-O-CH₃) dan sering

juga struktur cincin bukan aromatik. Senyawa fenol cenderung larut dalam air, karena paling sering terdapat dalam bentuk senyawa glukosida dan biasanya terdapat dalam rongga sel (Pratt & Hudson, 1990).

b. Antioksidan Sintesis

Antioksidan sintesis merupakan antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Diantara beberapa contoh antioksidan sintesis yang diijinkan untuk makanan, ada empat antioksidan yang penggunaannya meluas dan menyebar di seluruh dunia, yaitu BHA, BHT, TBHQ dan propil galat. Antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintesis untuk tujuan komersial (Trilaksani, 2003).

Gambar II.5 Struktur antioksidan sintesis, BHT, TBHQ, BHA dan Propil Galat



II.3 Tinjauan Metode

Tinjauan metode ini meliputi ekstraksi, fraksinasi, kromatografi lapis tipis dan tinjauan metode uji aktivitas antioksidan.

II.3.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan atau pemisahan komponen atau zat aktif suatu simpanan simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Secara umum, ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan pelarut non polar lalu dengan pelarut yang kepolarannya menengah kemudian dengan pelarut polar, dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar dan polar. Metode ini berguna bila kita bekerja dengan skala gram. Sedangkan ekstraksi tunggal dilakukan dengan cara merendam sampel dengan satu jenis pelarut tertentu. Bila menggunakan beberapa pelarut yang berbeda maka pada setiap pelarut dicampurkan dengan sampel yang belum pernah dilarutkan dengan pelarut lain sebelumnya (Harbone, 1987)

II.3.2 Kromatografi

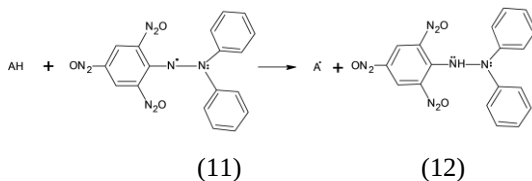
Kromatografi lapis tipis adalah metode pemisahan fisikokimia. Lapisan yang memisahkan yang terdiri atas bahan butir-butir (fase diam), ditempatkan pada penyangga berupa plat, logam atau lapisan yang cocok. Campuran yang akan dipisah berupa larutan, ditotolkan berupa bercak atau pita. Setelah plat atau lapisan ditaruh dalam bejana tertutup rapat yang berisi larutan pengembang yang cocok (fase gerak), pemisahan yang terjadi selama perambatan kapiler atau pengembangan (Stahl, 1985).

II.3.3 Pengujian Antioksidan Dengan Metode DPPH

Metode DPPH digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron atau hidrogen. Metode DPPH merupakan metode yang dapat mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar maupun nonpolar. Metode DPPH mengukur semua komponen antioksidan, baik yang larut dalam lemak ataupun dalam air. Metode DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel.

Senyawa ini mempunyai ciri-ciri padatnya berwarna ungu kehitaman, larut dalam pelarut DMF (dimetilformamida) atau metanol, titik didih 127-129°C, panjang gelombang maksimal sebesar 517 nm, berat molekul 394,3 g/mol dan rumus molekul $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (Prakash dkk., 2001). Radikal bebas DPPH bersifat peka terhadap cahaya, oksigen dan pH, tetapi bersifat stabil dalam bentuk radikal sehingga memungkinkan untuk dilakukan pengukuran antioksidan (Molyneux, 2003).

Gambar II.6. Struktur DPPH: (11) bentuk radikal dan (12) bentuk tereduksi



Suatu zat dapat dikatakan mempunyai sifat antioksidan yang sangat kuat bila nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$. Bila nilai IC_{50} adalah rentang 50-100 $\mu\text{g/mL}$ maka zat tersebut dinyatakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat. Aktivitas antioksidan sedang jika nilai IC_{50} adalah rentang 100-150 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan aktivitas antioksidan dikatakan lemah apabila nilai IC_{50} lebih dari 150 $\mu\text{g/mL}$ (Blois,1958).