

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK
ALGA MERAH (*Gracillaria arcuata*)
ASAL KABUPATEN PINRANG**



**MELINA MARIANGELLA MALLI
N11105056**



Tgl. Terima	15-12-09
Asal/Dari	Farmasi
Banyaknya	1 kg
Harga	10000
No. Invoice	
No. Kias	

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ALGA MERAH
(*Gracillaria arcuata*) ASAL KABUPATEN PINRANG**

SKRIPSI

**untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi
syarat-syarat untuk mencapai gelar sarjana**

**MELINA MARIANGELLA MALLI
N11105056**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2009**

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ALGA MERAH (*Gracillaria arcuata*) ASAL KABUPATEN PINRANG



MELINA MARIANGELLA MALLI

N11105056

Disetujui oleh :

Pembimbing Utama

Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt.
NIP. 19481002 198203 2 001

Pembimbing Pertama,

Dra. Rahmawati Syukur, M.Si., Apt.
NIP. 19651010 199203 2 002

Pembimbing Kedua,

Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si., Apt.
NIP. 19470314 198003 1 001

Pada tanggal,

2009

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkah dan rahmat-Nya jualah sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini sebagai persyaratan untuk menyelesaikan studi di Program Studi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini banyak rintangan dan hambatan yang dihadapi, namun dengan doa dan bantuan dari berbagai pihak, skripsi ini dapat terselesaikan. Oleh karena itu, perkenankanlah penulis mengungkapkan rasa terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada Bapak Drs. Kus Haryono, M.S., Apt. selaku penasehat akademik yang telah membimbing dan mengarahkan penulis selama mengikuti perkuliahan, Ibu Dra. Christiana Lethe, M.Si., Apt selaku pembimbing utama, Ibu Dra. Rahmawati Syukur, M.Si, Apt selaku pembimbing pertama dan Bapak Drs. H. Hasyim Bariun, M.Si, Apt selaku pembimbing kedua yang dengan ikhlas telah meluangkan waktu dan pikirannya untuk memberikan petunjuk dan bimbingan kepada penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis juga ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada : Dekan, Pembantu Dekan I, Pembantu Dekan II Fakultas Farmasi; bapak / Ibu Dosen Fakultas Farmasi, seluruh Kepala Laboratorium dan seluruh staf serta

pegawai Fakultas Farmasi, terkhusus pada Pak Suayeb, Kak Cia, Kak Sumi, Pak Esan, Kak Eci, dan Ibu Adri.

Rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga juga penulis haturkan kepada ayahanda tercinta **Yohanis malli** dan ibunda **Sabina Sarah** yang selalu memberikan dukungan yang tidak akan mampu penulis balas sampai akhir hayat, yang senantiasa memanjatkan doa sebagai pemacu bagi penulis dalam menghadapi tantangan maupun rintangan selama ini, begitupula dengan kakak-kakak (Lorenzius, Yulius Malli dan Meinarti, Ferdinand Malli, dan Ronald Malli) dan para keponakan (Marcello Malli, Roger Malli, dan Valentina Malli) yang selalu menjadi pembangkit semangat. Tak lupa penulis ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada seluruh kerabat keluarga yang telah banyak membantu selama menghadapi dunia perkuliahan, khususnya keluarga Alm. Viktor Malli (Nenek Malli, Tante Elly dan Om Itto, Om Ottes dan Tante Rosi, Wilson Malli, Angela Feriska, dan Nicolin Mbula) dan keluarga Ir. Donatus Marru (Om Toto dan Tante Erna, Caesar, Fadian, Yolanda, Olivia, Tante Emi, dan Dodi).

Kepada rekan-rekan mahasiswa Farmasi angkatan 2005, khususnya teman-teman tercinta T2 Crabs Crews (Lukman 'Luket', Indra, Cikka yanti, Dessy, Jeane, Dina, Indah 'Blukuk', Lina, Paulin 'my perfect partner', Dwi 'WB', Juli, Shita, Fandi, Serly, Alwa, Eka Riani dan Eka G.), terima kasih atas bantuan dan kebersamaannya selama penulis menuntut ilmu serta dalam penyelesaian skripsi ini, kenangan terindah adalah saat-saat manis bersama

kalian. Suatu saat mungkin kita akan berpisah dengan jalan masing-masing, tapi kenangan itu akan selalu ada dan hidup dalam hati kita.

Begitu pula para sahabat Brownies Club Yolanda Imelda, Thesa Minanga, S.T., Fernita Sari Gala, S.T., dan Sri Mardiah yang turut membantu dalam memotivasi untuk segera menyelesaikan skripsi ini. Teruntuk teman-teman MMRT khususnya Ferlie, Berlin, Dodi, Cantika Maharani, Andi, Yudie, Whira, dan Riswan terima kasih atas kerjasama dan kebersamaannya. Saudara-saudaraku di ILMI 2005 SMAN 4 Kendari khususnya Edit Team (Christine, Hartanti, Ari Herdianto, Nirwan Ariyadi, Defri Van Alfa, Putu Adi), Febriyanto Sihombing, Eko Pieter, Johannes Krismantyo dan semua teman yang tak sempat penulis sebutkan satu persatu, terima kasih atas segala motivasi dan kerjasamanya. Tak lupa pula kepada keluarga besar PMKO Filadelfia MIPA-Farmasi, Sun of My Soul Choir, dan Serafim Choir terima kasih atas dukungan doa kalian semua. Terkhusus Katon, Kak Itha, Kak Cici, dan Kak kresna tiada kata yang dapat terucap selain terima kasih untuk segala dukungan, doa, dan arti kebersamaan yang telah kalian beri.

Penulis sadar skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, kata pepatah "Tak ada gading yang tak retak". Di dunia tak ada satupun yang sempurna karena kesempurnaan hanya milik-Nya. Maka dari itu saran dan kritik membangun sangat penulis harapkan guna tambahan wawasan agar dalam pengerjaan penelitian selanjutnya dapat lebih baik.

Akhirnya semoga karya kecil ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang farmasi, amin. Tuhan memberkati

Makassar, November 2009

Melina Mariangella Malli

ABSTRAK

Penelitian uji aktivitas antioksidan dari alga merah *Gracillaria arcuata* telah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang dengan menggunakan metode pengikatan radikal bebas 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Alga merah *Gracillaria arcuata* diekstraksi dengan cara maserasi metanol 80%, kemudian dipartisi dengan cara ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-hexan-air (1:1) kemudian dilanjutkan dengan campuran air-kloroform (1:1). Ekstrak n-hexan, kloroform dan air dari alga merah *Gracillaria arcuata* memiliki aktivitas antioksidan dengan pengikatan radikal bebas terbesar pada masing-masing ekstrak n-hexan, kloroform, dan air berturut-turut yaitu 33,62%; 24,95%; dan 41,07%. Lebih kecil jika dibanding dengan β -karoten yang memiliki pengikatan radikal bebas sebesar 79,13%.

ABSTRACT

The study tested of the antioxidant activity of red algae *Gracillaria Arcuata* has been carried out. This study aims to determine the antioxidant activity of red algae *Gracillaria Arcuata* from Pinrang Regency and method of free radicals binding 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Red algae *Gracillaria Arcuata* extracted by maceration 80% methanol, and then partitioned by liquids extraction using the solvent n-hexane-water (1:1) followed by a mixture of water-chloroform (1:1). N-hexane extract, chloroform and water from the red algae *Gracillaria Arcuata* have antioxidant activity with the largest binding free radicals on each extract of n-hexane, chloroform, and water respectively are 33.62%; 24.95%; and 41.07%. Lower if compared with β -carotene which has binding free radicals by 79.13%.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Uraian Sampel	4
II.2 Metode Ekstraksi	6
II.3 Tinjauan Umum Antioksidan.....	10
II.4 Uraian Umum β – Karoten dan Peranannya Sebagai Antioksidan	17
II.5 Radikal Bebas.....	19
II.6 Spektrofotometer UV-VIS	22
BAB III PELAKSANAAN PENELITIAN	26
III.1 Alat dan Bahan yang Digunakan	26
III.2 Penyiapan Sampel	26

III.3 Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Metode DPPH.....	27
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
IV.1 Hasil Penelitian	29
IV.2 Pembahasan	30
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	34
V.1 Kesimpulan	34
V.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Persen pengikatan radikal bebas ekstrak alga merah <i>Gracillaria arcuata</i> asal Kabupaten Pinrang.....	29
2. Persen pengikatan radikal bebas dan IC ₅₀ dari pembanding β -Karoten	30
3. Hasil Pengukuran Serapan DPPH yang Tidak Terikat Oleh alga merah <i>Gracillaria arcuata</i>	42
4. Hasil Pengukuran Serapan DPPH yang Tidak Terikat Oleh β -Karoten.....	43
5. Hasil Perhitungan IC ₅₀ β – Karoten.....	44

BAB I PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menetralkan atau meredam radikal bebas, serta menghambat terjadinya oksidasi pada sel tubuh, sehingga dapat mencegah atau mengurangi terjadinya kerusakan sel (1). Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan (2).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok yaitu antioksidan primer disebut antioksidan enzimatis (meliputi enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroxidase), antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non-enzimatis (meliputi vitamin E, vitamin C, karotenoid, dan flavonoid), dan antioksidan tersier meliputi sistem DNA-repair dan metionin reduktase. Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya (3).

Laut, seperti halnya daratan, dihuni oleh biota, yakni tumbuhan-tumbuhan, hewan dan mikroorganisme. Biota laut menghuni hampir semua bagian laut, mulai dari pantai, permukaan laut sampai dasar laut yang terjeluk sekalipun. Laut sebagai lingkungan hidup berbagai jenis biota laut yang banyak di antaranya berpotensi untuk dijadikan sumber pangan yang berlimpah, menawarkan kesempatan yang besar kepada manusia untuk dimanfaatkan (4). Alga yang dikonsumsi memiliki nilai

nutrisi yang tinggi sebagai sumber mineral, vitamin, dan serat yang berhubungan dengan diet nonkalori, dan sebagai sumber antioksidan yang potensial (5).

Pada alga merah pigmen-pigmen dari kromofor terdiri dari klorofil biasa bersama-sama dengan santofil, karotin dan sebagai tambahan fikoeritrin yang merah dan kadang-kadang fikosianin (4).

Telah dilaporkan hasil uji aktivitas antioksidan dari tiga ekstrak alga hijau *Ulva reticulata*, yaitu ekstrak n-heksan, kloroform, dan ekstrak air, dengan nilai IC_{50} masing-masing adalah 980 $\mu\text{g/ml}$, 703 $\mu\text{g/ml}$, dan 366 $\mu\text{g/ml}$, menggunakan vitamin C sebagai kontrol positif dengan IC_{50} sebesar 21 $\mu\text{g/ml}$ (2).

Juga telah dilaporkan hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak kloroform dari beberapa alga merah, yaitu *Gloipeltis tenax*, *Grateloupia elliptica*, dan *Gelidium amansii*, adalah berkisar antara 3,8% - 4,4% (5).

Saat ini terdapat produk-produk yang mengandung antioksidan yang berasal dari alga, salah satu contohnya adalah Asthin Force[®] yang mengandung antioksidan astaxanthin yang merupakan karotenoid alami yang dapat ditemukan pada mikroalga di seluruh dunia, mulai dari danau tropis sampai padang salju antartika. Keunggulan astaxanthin yaitu daya antioksidannya yang lebih kuat dibanding beberapa antioksidannya lainnya seperti vitamin E, vitamin C, dan beta-karoten (6).

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital

luarnya yang menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya (3). Beberapa senyawa oksigen reaktif merupakan radikal bebas. Kebanyakan dari efek oksigen yang berpotensi membahayakan menjadi penyebab pembentukan oksigen reaktif yang memiliki aktivitas sebagai oksidan (7).

Alga merah *Gracillaria arcuata* mengandung pigmen klorofil dan karotenoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (2,4), maka permasalahan yang timbul adalah apakah sampel alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian ini dilakukan secara ekperimental menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl 2-picril hydrazil), dengan hipotesa bahwa makin tinggi konsentrasi ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata* akan memiliki nilai IC_{50} makin kecil.

Penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk mengetahui aktivitas antioksidan alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang terhadap pengikatan radikal bebas DPPH (1,1-Diphenyl 2-picril hydrazil) dengan tujuan untuk memperoleh informasi mengenai aktivitas antioksidan dari alga merah *Gracillaria arcuata*, yang dapat digunakan lebih lanjut dalam upaya pemanfaatan alga dalam bidang farmasi seperti pembuatan krim dan tablet antioksidan.

luarnya yang menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan, dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya (3). Beberapa senyawa oksigen reaktif merupakan radikal bebas. Kebanyakan dari efek oksigen yang berpotensi membahayakan menjadi penyebab pembentukan oksigen reaktif yang memiliki aktivitas sebagai oksidan (7).

Alga merah *Gracillaria arcuata* mengandung pigmen klorofil dan karotenoid yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (2,4), maka permasalahan yang timbul adalah apakah sampel alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian ini dilakukan secara ekperimental menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl 2-picril hydrazil), dengan hipotesa bahwa makin tinggi konsentrasi ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata* akan memiliki nilai IC_{50} makin kecil.

Penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk mengetahui aktivitas antioksidan alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang terhadap pengikatan radikal bebas DPPH (1,1-Diphenyl 2-picril hydrazil) dengan tujuan untuk memperoleh informasi mengenai aktivitas antioksidan dari alga merah *Gracillaria arcuata*, yang dapat digunakan lebih lanjut dalam upaya pemanfaatan alga dalam bidang farmasi seperti pembuatan krim dan tablet antioksidan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Uraian Sampel

II.1.1 Klasifikasi Sampel (8)

Klasifikasi *Gracillaria arcuata* sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisio : Rhodophyta
Kelas : Rhodophyceae
Bangsa : Gigartinales
Suku : Gracilariaceae
Marga : Gracillaria
Spesies : *Gracillaria arcuata*

II.1.2 Nama Daerah (8)

Sulawesi : Sango-sango atau agar-agar.

II.1.3 Morfologi

Gracillaria arcuata merupakan alga merah (rodhophyceae). Alga merah memiliki pigmen dominan fikoeritrin dan fikosianin yang menimbulkan warna merah, walaupun pada kenyataannya di alam menunjukkan variasi warna lain seperti hijau, ungu dan coklat tua karena sifat adaptik kromatiknya yaitu penyesuaian antara proporsi pigmen dengan berbagai kualitas pencahayaan. Sebagai indikasi bahwa itu adalah alga merah, yaitu apabila terjemur sinar matahari akan tampak berubah warna asalnya pigmennya (9).

Ciri-ciri *Gracillaria arcuata* antara lain yaitu thallus silindris, licin, dan berwarna kuning-cokelat, kuning-hijau, atau hijau. Percabangan berseling tidak beraturan, memusat ke arah pangkal. Panjang thallus mencapai 25-30 cm dengan diameter thallus 0,5-2 mm (8).

II.1.4 Habitat (8)

Gracillaria arcuata dapat tumbuh melekat pada terumbu karang dengan air jernih dan arus cukup, di samping itu juga dapat tumbuh di sekitar muara sungai dan dapat dibudidayakan di dalam tambak. Salinitas ideal berkisar 20-28 per mil dengan pH 6-9.

II.1.5 Kegunaan

Alga merah merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai *reversal agent*, fungisida, dan herbisida (10).

Agar yang dihasilkan dari ekstraksi *Gracillaria arcuata* sebagian besar digunakan oleh industri makanan dalam bentuk *jelly*, *ice cream*, makanan kaleng (daging dan ikan), roti (bakery), permen, manisan, dan selai. Agarose merupakan senyawa agar yang telah dipisahkan dari unit molekul agaropektin, memiliki kemampuan membentuk gel yang kuat sehingga banyak digunakan di bidang teknologi. Di bidang kesehatan, air rebusan *Gracillaria arcuata* digunakan untuk pengobatan *hemorroid* dan penyakit gangguan akibat kekurangan iodium (GAKI) dan penyakit urinaria (8).

II.1.6 Kandungan Kimia

Alga memiliki kandungan karbohidrat (gula atau *vegetable-gum*), protein, protein sedikit lemak, dan abu. Selain itu juga mengandung vitamin-vitamin seperti vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, dan C; betakaroten; serta mineral seperti kalium, kalsium, fosfor, natrium, zat besi, dan yodium (8). Pada alga merah, pigmen-pigmen terdiri dari klorofil biasa bersama-sama dengan santofil, karoten dan sebagai tambahan fikoeritrin yang merah dan kadang-kadang fikosianin (4). *Gracillaria arcuata* merupakan penghasil utama dari agar yang merupakan senyawa polisakarida dengan rantai panjang yang disusun oleh ulangan dari pasangan dua unit molekul *agarose* dan *agaropektin* (8).

II.2 Metode Ekstraksi

II.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, di luar pengaruh cahaya matahari langsung. Ekstrak kering harus mudah dikeringkan (11).

II.2.2 Definisi Ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian komponen kimia atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis hewan termasuk biota laut. Komponen kimia yang terdapat pada tanaman, hewan dan beberapa jenis ikan pada umumnya mengandung senyawa-senyawa yang mudah larut dalam pelarut organik. Pelarut organik yang paling umum digunakan

untuk mengekstraksikan komponen kimia dari sel tanaman adalah metanol, etanol, kloroform, n-heksan, eter, aseton, benzen dan etil asetat (11).

II.2.3 Tujuan Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat dalam bahan alam baik dari tumbuhan, hewan dan biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus dinding sel dan masuk dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan karena adanya perbedaan antara konsentrasi di dalam dan konsentrasi diluar sel, mengakibatkan terjadinya difusi pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (12).

II.2.4 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi bahan alam terdiri atas (11):

- a. Secara panas, seperti refluks dan destilasi uap air karena sampel langsung dipanaskan dengan pelarut, dimana umumnya digunakan untuk sampel yang mempunyai bentuk dan dinding sel yang tebal. Metode ekstraksi secara panas digunakan untuk sampel yang tahan panas dan mempunyai tekstur yang keras seperti batang, akar dan biji.

- b. Secara dingin, seperti maserasi, perkolasi dan soxhletasi, dimana untuk maserasi dilakukan dengan cara merendam simplisia, sedangkan soxhletasi dengan cairan penyari dipanaskan dan uap cairan penyari naik ke kondensor, kemudia terjadi kondensasi dan turun menyari simplisia. Ekstraksi secara dingin digunakan untuk sampel yang lunak, tidak tahan panas, tidak mudah mengembang dalam cairan penyari.

II.2.5 Penyarian Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus yang cocok kedalam sebuah bejana, dituang dengan 75 bagian penyari dan ditutup, serta dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sekali-kali diaduk, dikerai dan diperas, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya sampai diperoleh 100 bagian. Pindahkan ke dalam bejana tertutup, biarkan di tempat sejuk dan terlindung dari cahaya selama 2 hari. Endapan yang terbentuk dipisahkan dan dipekatkan. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar. Peristiwa tersebut terjadi berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (11).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat yang mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, sitrat dan lain-lainnya. Cairan penyari yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol, atau pelarut lain (11).

Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (13).

II.2.6 Ekstraksi Cair-Cair

Penyarian merupakan proses pemisahan dimana suatu zat terbagi dalam dua pelarut yang tidak bercampur.

Pelarut yang sering digunakan adalah air dan pelarut organik yang tidak bercampur dengan air. Dengan demikian senyawa organik polar sebagian besar akan terdapat dalam fase organik. Hal ini yang dikatakan "like dissolves like" yang berarti bahwa senyawa polar akan mudah larut dalam pelarut polar dan sebaliknya.

Jika suatu ekstrak dipisahkan dalam dua pelarut yang tidak bercampur satu sama lain maka akan terbentuk dua lapisan. Komponen dari ekstrak akan memiliki kelarutan dalam dua lapisan tersebut (biasanya disebut fase) dan setelah beberapa waktu akan tercapai keseimbangan konsentrasi dalam dua lapisan. Waktu yang diperlukan

untuk tercapainya keseimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran kedua fase tersebut dalam corong pisah (14).

II.3 Tinjauan Umum Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tidak reaktif yang stabil. Jika dikaitkan dengan penyakit, antioksidan dapat didefinisikan sebagai senyawa-senyawa yang melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif (15). Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif atau spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler, dan penuaan (16).

Dalam pengertian kimia, senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron. Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidan dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat (3).

Zat-zat yang memiliki sifat antioksidan adalah senyawa polifenol, indol, monoterpen, katekin, enzim, flavonoida dan karotenoida (17). Senyawa polifenol mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara

manyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyak radikal bebas menjadi berkurang (18).

II.3.1 Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan melindungi sel dan jaringan sasaran dengan cara (19) :

1. memusnahkan (*scavenge*) radikal bebas secara enzimatik atau dengan reaksi kimia langsung
2. mengurangi pembentukan radikal bebas
3. mengikat ion logam yang terlibat dalam pembentukan spesies yang reaktif (transferin, seruloplasmin, albumin)
4. memperbaiki kerusakan sasaran
5. menghancurkan molekul yang rusak dan menggantinya dengan yang baru.

II.3.2 Jenis-Jenis Antioksidan

Secara umum, antioksidan dikelompokkan menjadi 2, yaitu

enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatik

misalnya enzim superoksida

dismutase (GSH-PX), serta

melindungi dengan cara

menetralkan radikal



antioksidan dalam sayuran dan buah-buahan meliputi vitamin C, vitamin E, β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, dan isokatekin, serta asam lipoat (3).

Enzim antioksidan dalam tubuh biasanya akan memerangi radikal bebas dalam jumlah normal. Jika jumlah radikal bebas melebihi jumlah yang dapat ditangani enzim tubuh, zat-zat antioksidan dari luar seperti, vitamin A, C dan E akan bekerja. Antioksidan mencegah pembentukan lebih lanjut radikal bebas dengan memberikan elektron untuk menstabilisasi radikal bebas. Mengonsumsi suplemen vitamin dan mineral memegang peran penting dalam membantu tubuh menghancurkan dan mengeluarkan unsur-unsur kimia beracun dari dalam tubuh (19).

Antioksidan sintetis seperti BHA (Butil Hidroksi Anisol), BHT (Butil Hidroksil Toluena), PG (Propil Galat) dan TBHQ (tetra-butil hidrokinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogen, sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan (17).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi 3 kelompok, yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier. Antioksidan primer juga disebut antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer, apabila dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil, misalnya enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan

glutation peroksidase (GSH-Px). Antioksidan sekunder juga disebut antioksidan eksogenus (non-enzimatis), kerja sistem antioksidan ini yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan cara menangkapnya. Akibatnya, radikal bebas tidak akan beraksi dengan komponen seluler, misalnya vitamin E, vitamin C, β -karoten, flavonoid, asam urat, bilirubin dan albumin. Sedangkan kelompok antioksidan terseir meliputi sistem enzim DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim–enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas (3).

II.3.3 Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan menggunakan metode dengan beberapa pereaksi, antara lain (16):

1. Pereaksi DPPH

Metode dengan pereaksi DPPH untuk skrining antioksidan diperkenalkan oleh Blois (1958). DPPH merupakan molekul radikal bebas yang stabil yang ditandai oleh delokalisasi cadangan elektron disekeliling molekulnya secara keseluruhan dengan baik sehingga tidak akan membentuk dimer seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya. Prinsipnya berdasarkan reaksi antara antioksidan dengan DPPH radikal melalui donasi proton. Dengan demikian antioksidan yang bekerja dengan menangkap radikal (*radical scavenger*) dapat dideteksi dengan pereaksi ini. Prinsip penentuan aktivitas antioksidan ini berdasarkan pengukuran serapan senyawa hasil reaksi antara DPPH dengan senyawa

antioksidan. Antioksidan akan mendonorkan protonnya kepada DPPH radikal yang berwarna ungu dan akan menghasilkan senyawa yang tidak berwarna. Penurunan intensitas warna ungu larutan DPPH akan diperlihatkan sejalan dengan konsentrasi antioksidan senyawa yang terlihat seperti reaksi berikut (16) :



Besarnya aktivitas dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang merupakan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% radikal DPPH (16).

Contoh Perhitungan IC_{50}

[C] µg/ml	Log [C] (x)	%pengikatan DPPH	Probit (y)
750	0,875	79,13	5,81
500	0,698	70,34	5,53
250	0,197	56,36	5,16
125	0,096	44,91	4,86

$$y = a + bx, y = IC_{50} = 5,00$$

$$y = 2,293 + 1,210 x$$

$$x = \frac{(5,00 - 2,293)}{1,210}$$

$$x = 2,237$$

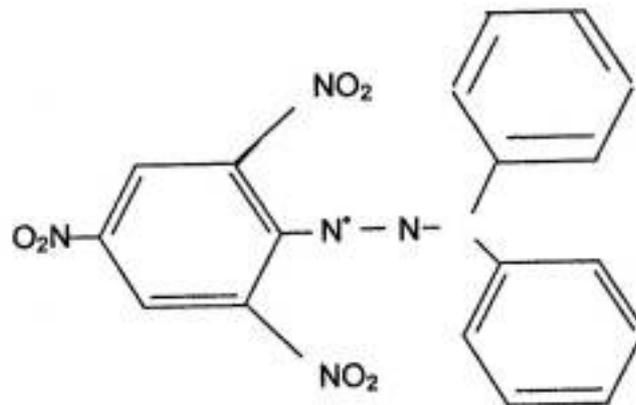
$$\text{Antilog } x (IC_{50}) = 172,65 \mu\text{g/ml}$$

Uraian pereaksi DPPH (21) :

Nama kimia : 2,2-Diphenyl-1-Picryl Hydrazyl

Rumus Kimia : $C_{18}H_{12}N_5O_6$

Berat molekul: 349,3



Gambar 1. Struktur kimia molekul DPPH

2. Pereaksi linoleat-tiosianat

Pereaksi yang digunakan adalah asam linoleat sebagai sumber radikal yang merupakan asam lemak tidak jenuh. Radikal ini akan mengoksidasi ion ferro (dari feroklorida) menjadi ion feri, dengan adanya ion tiosianat akan menghasilkan kompleks feri-tiosianat yang berwarna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm (16).

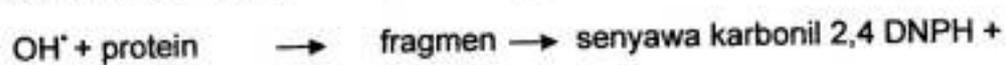
3. Pereaksi tiosianat

Metode ini menggunakan pereaksi 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorida (AAPH) sebagai inisiator pembentukan radikal. Penguraian senyawa ini terjadi dengan bantuan pemanasan menghasilkan molekul nitrogen dan radikal karbon yang dapat bergabung menghasilkan produk

yang stabil atau bereaksi dengan molekul oksigen menghasilkan radikal peroksil, sedangkan lemak yang dioksidasi menghasilkan produk primer peroksida. Dalam metode ini bilangan peroksida dinyatakan sebagai kemampuan senyawa mengoksidasi Fe^{2+} menjadi Fe^{3+} , selanjutnya Fe^{3+} yang terbentuk bereaksi dengan ion CNS menghasilkan warna merah yang memberikan panjang gelombang maksimum 500 nm. Makin lama waktu inkubasi, nilai serapan makin meningkat, yang berarti bahwa asam linoleat dalam sampel telah mengalami oksidasi. Meningkatnya intensitas warna merah menunjukkan meningkatnya bilangan peroksida. Kemampuan aktivitas antioksidan pada metode dengan pereaksi tiosianat dilihat dari rendahnya nilai serapan yang terbentuk dibandingkan konsentrasi. Makin rendah serapan berarti makin sedikit peroksida yang dihasilkan (16).

4. Pereaksi DNPH

Metode ini dengan pereaksi DNPH ini digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan terhadap radikal hidroksil yang dihasilkan dari reaksi antara H_2O_2 dan $Fe(III)$ -EDTA dengan penambahan asam askorbat pH 7,4. Penambahan asam askorbat ini akan mempercepat laju pembentukan radikal hidroksil dengan cara mereduksi besi dan mempertahankan penyediaan $Fe(III)$. Reaksi yang terjadi adalah (16) :



Senyawa karbonil \rightarrow kromogen

Senyawa karbonil yang dihasilkan diukur dengan pereaksi DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazin) yang dimodifikasi. Warna yang dihasilkan diukur serapannya pada panjang gelombang 390 nm (16).

II. 4 Uraian Umum β - Karoten dan Peranannya Sebagai Antioksidan

Karotenoid yaitu tetraterpenoid C_{40} , merupakan golongan pigmen yang larut lipid dan tersebar luas, terdapat dalam semua jenis tumbuhan, mulai dari bakteri sederhana sampai ke Compositae yang berbunga kuning. Pada hewan suatu karotenoid khusus yaitu β -karoten, merupakan makanan yang diperlukan karena merupakan sumber vitamin A, yaitu suatu isoprenoid alkohol C_{20} . Vitamin A ini diperoleh setelah β -karoten mengalami hidrasi dan molekulnya terpecah dua (11).

Karotenoid terbagi atas dua kelas, yaitu (22):

1. Karoten : hidrokarbon, larut dalam petroleum eter

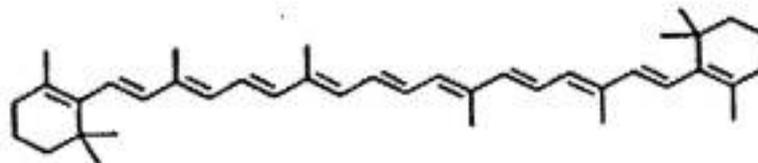
Contohnya adalah α -karoten, β -karoten dan γ -karoten

2. Xantofil : turunan teroksidasi dari karoten. Senyawanya adalah alkohol, aldehid, keton, epoksid, dan asam-asam yang larut dalam etanol. Contohnya adalah lutein (monohidroksikaroten), Zeaxantin (dihidroksikaroten), atau violaxantin (dihidroksi epoksidikaroten).

Sifat antioksidan karotenoid melindungi tanaman dan mikroorganisme dari sinar matahari yang merusak, sedangkan pada tubuh manusia, karotenoid melindungi tubuh dari radikal bebas perusak sel (22).

β -karoten merupakan salah satu dari sekitar 500 karotenoid yang ada di alam dan mempunyai aktivitas vitamin A paling tinggi. Dalam metabolisme, diperkirakan 1/3 β -karoten diabsorpsi dan separuhnya diubah menjadi retinol (vitamin A). Secara teoritis setiap 30 mg β -karoten dapat menghasilkan 5 mg retinol (23).

β -karoten merupakan kristal prisma berwarna merah, mempunyai titik lebur 183° , sedikit larut dibanding α -karoten, larut dalam benzen dan kloroform, cukup larut dalam eter, petroleum eter dan minyak-minyak, praktis tidak larut dalam air, asam dan alkali. Larutannya berwarna kuning, mengabsorpsi oksigen dari udara yang mempercepat terjadinya produk yang tidak aktif (24).



Gambar 2. Rumus Struktur β -karoten

Karotenoid tertentu yang mempunyai struktur kimia khusus mampu menetralkan atau memadamkan singlet oksigen (suatu molekul reaktif yang dapat menghasilkan radikal bebas yang tidak stabil pada waktu proses pemindahan energi ke molekul lain) dengan cara menghamburkan energi keseluruhan molekul karotenoid (23).

Supaya dapat memadamkan singlet oksigen tersebut, karotenoid harus mempunyai sedikitnya 9 ikatan rangkap dengan ikatan tunggal diantara ikatan rangkap. Susunan ikatan kimia ini dinamakan *conjugated double bonds*. β -karoten mempunyai 11 ikatan kimia tersebut. Energi dari

singlet oksigen dipindahkan ke β -karoten dan dihamburkan keseluruhan ikatan tunggal dan rangkap, kemudian dilepas sebagai panas dan molekul β -karoten kembali ke energi semula. Pada saat itu singlet oksigen telah diubah menjadi oksigen normal. β -karoten tidak rusak oleh pemindahan energi dari singlet oksigen tersebut dan dapat mengulangi proses yang sama dengan singlet oksigen lain. 1 mol β -karoten mampu memadamkan sampai 1000 mol singlet oksigen. Kemampuan inilah yang membuat β -karoten merupakan pemadam (quencher) singlet oksigen yang sangat handal (23).

II.5 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang sangat reaktif dan memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (15). Radikal bebas cenderung mengambil partikel dari molekul lain yang kemudian menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh (25).

Radikal bebas yang terdapat dalam tubuh adalah hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, asam hipoklorat, oksigen singlet, dan peroksil (25). Zat gizi yang paling sensitif terhadap kerusakan oleh radikal bebas adalah asam lemak majemuk tak jenuh yang dikenal dengan lipid peroksidasi. Di luar tubuh asam lemak dalam makanan yang bereaksi dengan radikal bebas menghasilkan peroksidasi yang disebut tengik (16). Radikal bebas dan senyawa oksigen reaktif (reactive oxygen species/ROS) lainnya yang diproduksi dalam jumlah normal sangat

penting untuk menjaga fungsi biologis, seperti halnya sel darah putih menghasilkan hidropersida untuk membunuh beberapa jenis bakteri dan fungi. Namun, jika jumlahnya berlebihan akan mencari pasangan elektronnya dengan merampas secara radikal dari molekul lain yang mengakibatkan kerusakan oksidatif jaringan yang sering dikenal sebagai stres oksidatif (26).

Kerusakan yang dapat ditimbulkan oleh serangan radikal bebas antara lain : (27)

1). Membran sel

Terutama komponen penyusun membran berupa asam lemak tak jenuh yang merupakan bagian dari fosfolipid dan mungkin juga protein. Perusakan bagian dalam pembuluh darah akan akan mempermudah pengendapan berbagai zat pada bagian yang rusak tersebut, termasuk kolesterol, sehingga timbul aterosklerosis. Serangan radikal hidroksil pada asam lemak tak jenuh dimulai dengan interaksi oksigen pada rangkaian sehingga terbentuk lipid hidropersida, yang selanjutnya merusak bagian sel dimana hidropersida ini berada.

2). Kerusakan protein

Kerusakan protein termasuk oksidasi protein akan mengakibatkan kerusakan jaringan tempat protein itu berada, sebagai contoh kerusakan protein pada lensa mata mengakibatkan terjadinya katarak.

3). Kerusakan DNA

Radikal bebas hanya salah satu faktor dari banyak faktor yang menyebabkan kerusakan DNA. Penyebab lain misalnya virus, radiasi dan zat kimia karsinogen. Sebagai akibat kerusakan DNA ini dapat timbul penyakit kanker.

4). Peroksida lipid

Lipid dianggap molekul yang paling sensitif terhadap serangan radikal bebas sehingga terbentuk lipid peroksida. Terbentuknya lipid peroksida yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan lain dianggap salah satu penyebab terjadinya berbagai penyakit degeneratif.

5). Dapat menimbulkan autoimun

Autoimun adalah terbentuknya antibodi terhadap suatu sel tubuh biasa. Pada keadaan normal antibodi hanya terbentuk bila ada antigen yang masuk dalam tubuh. Adanya antibodi untuk sel tubuh biasa dapat merusak jaringan tubuh dan sangat berbahaya.

6). Proses ketuaan

Secara teori radikal bebas dapat dipunahkan oleh berbagai antioksidan, tetapi tidak pernah mencapai 100%. Karena itu secara pelan dan pasti terjadi kerusakan jaringan oleh radikal bebas yang tidak terpunahkan. Kerusakan jaringan secara pelan ini menyebabkan terjadinya ketuaan.

Radikal bebas mengakibatkan kerusakan sel yang pada ujungnya menimbulkan berbagai penyakit, seperti penuaan dini, penyakit jantung,

arthritis, kanker, katarak dsb. Radikal bebas adalah molekul yang tidak memiliki pasangan elektron, dan karena dalam keadaan normal elektron hadir secara berpasangan, radikal bebas memiliki tendensi untuk mencari pasangan elektronnya. Terkadang radikal bebas mengambil elektron yang telah berpasangan sehingga merobek membran sel dan merusak materi genetik, proses ini dikenal dengan nama oksidasi (26). Sebagian radikal bebas terbentuk sebagai hasil sampingan dari proses oksidasi atau pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernapas, olah raga yang berlebihan, gaya makan yang tidak sehat, peradangan atau ketika tubuh berhadapan dengan polusi lingkungan seperti asap kendaraan bermotor, asap rokok, radiasi matahari dan sebagainya (19).

II.6 Spektrofotometer UV-VIS

Spektrofotometer UV-VIS adalah alat untuk mengukur transmitans dan serapan suatu contoh sebagai fungsi panjang gelombang. Pengukuran terhadap suatu deretan contoh pada suatu panjang gelombang tunggal mungkin juga dapat dilakukan (28).

II.6.1 Prinsip Dasar

Absorpsi cahaya UV atau cahaya tampak mengakibatkan transisi elektronik, yaitu promosi elektron dari orbital keadaan dasar yang berenergi rendah ke orbital keadaan tereksitasi berenergi lebih tinggi. Transisi ini memerlukan 40-300 kkal/mol. Energi yang terserap selanjutnya terbuang sebagai kalor, atau tersalurkan dalam reaksi kimia (misalnya isomerisasi atau reaksi radikal bebas) (28).

Panjang gelombang cahaya UV atau cahaya tampak bergantung pada mudah promosi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk promosi elektron, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi yang lebih sedikit, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih panjang. Senyawa yang menyerap cahaya pada daerah tampak (yakni senyawa berwarna) mempunyai elektron yang lebih mudah dipromosikan daripada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV yang lebih pendek (28).

Molekul selalu mengabsorpsi cahaya elektromagnetik jika frekuensi cahaya ini sama dengan frekuensi getaran molekul tersebut. Elektron yang terikat dan yang tidak terikat akan tereksitasi pada daerah frekuensi yang sesuai dengan cahaya tampak dan cahaya UV (28).

Keadaan dasar suatu molekul organik mengandung elektron-elektron valensi dalam tiga tipe utama orbital molekul, yaitu orbital sigma (σ); orbital pi (π); dan orbital terisi tapi tak terikat (n). Elektron sigma (σ) seperti pada ikatan tunggal C-C, contoh : H-O-H; R-O-H; R-O-R; R-NH₂; CH₃-Br dan CH₃-I. Elektron pi (π), terdapat pada ikatan rangkap karbon-karbon alkena dan alkuna, contoh: C=O; -N=N-. Sedangkan elektron n terdapat pada CH₃OH (28).

Bagian molekul yang mengabsorpsi dalam daerah UV dan daerah sinar tampak dinyatakan sebagai kromofor. Dalam suatu molekul dapat terdapat beberapa kromofor. Jika kromofor dipisahkan satu sama

lainpaling sedikit oleh dua atom karbon jenuh, maka tidak ada kemungkinan konjugasi antara gugus kromofor. Makin banyak ikatan rangkap terkonjugasi ditambahkan pada suatu molekul, makin kecil energi yang dibutuhkan untuk mencapai keadaan tereksitasi pertama. Konjugasi yang cukup akan menggeser absorpsi ke panjang gelombang dari daerah tampak dari spektrum itu (28).

II.6.2 Peralatan Spektrofotometer (28)

Komponen-komponen pokok dari spektrofotometer meliputi :

1. Sumber Tenaga Radiasi

Sumber radiasi yang ideal untuk pengukuran serapan harus menghasilkan spektrum kontinyu dengan intensitas yang seragam pada keseluruhan kisaran panjang gelombang yang sedang diamati. Sumber-sumber radiasi UV yang kebanyakan digunakan adalah lampu hidrogen dan lampu deuterium. Terdiri dari sepasang elektroda yang terselubung dalam tabung gelas dan diisi dengan gas hidrogen atau deuterium pada tekanan yang rendah dengan panjang gelombang 180-350 nm dan digunakan juga lampu xenon, tetapi lampu xenon tidak se-stabil lampu hidrogen. Selain itu sumber radiasi yang biasa digunakan adalah filamen tungsten yang menghasilkan radiasi kontinyu dalam daerah antara 350-2500 nm.

2. Monokromator

Dalam spektrofotometer, radiasi polikromatik diubah menjadi monokromatik. Ada dua jenis alat yang digunakan yaitu penyaring dan monokromator. Monokromator merupakan serangkaian alat optik yang

menguraikan radiasi polikromatik menjadi jalur-jalur yang efektif atau panjang gelombang tunggal.

3. Tempat Cuplikan (Kuvet)

Larutan ditempatkan dalam sel atau kuvet. Untuk daerah visibel digunakan gelas biasa atau quartz. Sel untuk larutan mempunyai panjang 1-10 cm. Sebelum sel dipakai harus dibersihkan dengan air atau jika dikehendaki dapat dicuci dengan detergen atau asam nitrat panas.

4. Detektor atau Pencatat

Detektor penyerap tenaga foton yang mengenai cuplikan dan merubah tenaga tersebut untuk diukur secara kuantitatif seperti sebagai arus listrik atau perubahan-perubahan panas. Kebanyakan detektor menghasilkan sinyal listrik yang dapat mengaktifkan meter atau pencatat.



Gambar 3. Diagram sederhana spektrofotometer

BAB III

PELAKSANAAN PENELITIAN

II.1 Alat dan Bahan yang digunakan

Alat-alat yang digunakan adalah alat-alat gelas, corong pisah 60 ml, freeze dryer (*Derby Unic*[®]), mikropipet 100-1000 μ l (*Socorex*[®]), neraca analitik (*Dragon 303*[®]), spektrofotometer UV-VIS (*Diode Array 8452A*[®]), seperangkat alat sentrifuge, dan timbangan kasar (*O'hauss HS-120*[®]).

Bahan-bahan yang digunakan adalah air suling, β -karoten murni (*Calbiochem*[®]), Diphenyl picril hydrazil hydrate (DPPH) (*Sigma*[®]), ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata*, etanol p.a (*E.Merck*[®]), kloroform teknis, metanol absolut (*E.Merck*[®]), metanol teknis, dan n-heksan teknis.

II.2 Penyiapan Sampel

II.2.1 Pengambilan Sampel

Sampel alga merah *Gracillaria arcuata* diambil dari hasil budi daya di Kabupaten Pinrang.

II.2.2 Pengolahan Sampel

Sampel dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian dipotong kecil-kecil.

II.2.3 Maserasi Sampel

Sampel *Gracillaria arcuata* segar yang telah dipotong kecil-kecil kemudian ditimbang sebanyak 1 kg, dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan direndam selama 3 hari dengan 3,5 liter metanol teknis

sambil sesekali diaduk. Disimpan di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung. Ekstrak metanol dipekatkan dengan menggunakan rotavapor hingga diperoleh ekstrak kental metanol. Garam dari ekstrak dihilangkan dengan menambahkan metanol p.a kemudian disentrifuge, pelarut diuapkan. Kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi cair-cair sehingga diperoleh 3 ekstrak yang berbeda tingkat kepolarannya yaitu ekstrak air (polar), ekstrak kloroform (semipolar), dan ekstrak heksan (nonpolar).

II.3 Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Metode DPPH (2)

II.3.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM

Larutan DPPH 0,4 mM dibuat dengan cara menimbang DPPH sebanyak 0,0157 g kemudian dilarutkan dengan 100 ml etanol absolut dalam labu tentukur (harus selalu dalam keadaan baru).

II.3.2 Pembuatan Larutan Pembanding

Pembanding β -karoten murni ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan metanol absolut sebanyak 10 ml sehingga diperoleh konsentrasi 10mg/ml sebagai larutan stok. Dari larutan stok masing-masing dipipet 375 μ l, 250 μ l, 125 μ l dan 62.5 μ l kemudian dicukupkan volumenya sampai 5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 0.75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0.25 mg/ml, dan 0,125 mg/ml (750 bpj, 500 bpj, 250 bpj dan 125 bpj).

II.3.3 Pembuatan Konsentrasi Sampel

Setiap ekstrak dari sampel *Gracillaria arcuata* ditimbang sebanyak 100 mg kemudian dilarutkan dengan etanol absolut 10 ml (10.000 bpj). Untuk mendapatkan konsentrasi 500 bpj, 1000 bpj, 1500 bpj, dan 2000 bpj larutan stok dipipet 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, dan 2 ml kemudian masing-masing dicukupkan hingga 10 ml dengan etanol absolut.

II.3.4 Pelaksanaan Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan

Sebanyak 100 μ L larutan contoh dan pembanding dari berbagai konsentrasi masing-masing ditambah 1 ml DPPH 0,4 mM dan dicukupkan volumenya sampai 5,0 ml dengan etanol absolut. Campuran tersebut dikocok dan dibiarkan selama 30 menit pada suhu kamar. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm. Dilakukan pula pengukuran serapan DPPH (blanko).

Persentase aktivitas antioksidan dihitung berdasarkan rumus :

$$\text{Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs. blanko} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. blanko}} \times 100\%$$

Persentase pengikatan radikal yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi uji kemudian ditabulasi dan dihitung nilai IC_{50} nya. Nilai IC_{50} ditentukan dengan analisis probit dari data, lalu dibandingkan dengan nilai IC_{50} β -karoten murni sebagai kontrol positif.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

IV.1 Hasil Penelitian

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata* menggunakan metode (DPPH 2,2-diphenyl-1-picrylhidrasil) dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini :

Tabel 1. Persen pengikatan radikal bebas dari ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata* asal Kabupaten Pinrang

Ekstrak	Konsentrasi (µg/ml)	% Pengikatan Radikal Bebas
Heksan	2000	33,62
	1500	21,76
	1000	14,05
	500	4,43
Kloroform	2000	24,95
	1500	17,52
	1000	10,88
	500	6,12
Air	2000	41,07
	1500	31,35
	1000	24,67
	500	14,37

Tabel 2. Persen pengikatan radikal bebas dari pembanding β – karoten

Ekstrak	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	% Pengikatan Radikal Bebas
Pembanding	750	79,13
	500	70,34
	250	56,36
	125	44,91

IV.2 Pembahasan

Penelitian uji antioksidan ini menggunakan sampel *Gracillaria arcuata* yang masih segar. Digunakan sampel segar sebab senyawa antioksidan tidak tahan terhadap panas matahari dan sinar UV, sehingga proses pengeringan diduga menyebabkan rusaknya senyawa antioksidan pada sampel tersebut.

Sampel segar ini kemudian dipotong kecil-kecil untuk memperbesar luas permukaan hingga kontak antara cairan penyari dan sampel lebih besar sehingga zat aktif yang diperoleh akan lebih banyak. Metode maserasi dipilih untuk mengekstraksi karena sampel yang digunakan bersifat lunak dan senyawa yang bersifat antioksidan umumnya tidak tahan pemanasan. Proses maserasi ini dilakukan berulang kali agar terjadi keseimbangan antara larutan di dalam dan di luar sel dan zat aktif yang diperoleh semakin banyak. Hasil ekstraksi ini kemudian dirotavapor hingga diperoleh ekstrak kental kemudian diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kasar kering yang masih mengandung garam. Ekstrak ini

kemudian dibebasgaramkan dengan cara ekstrak dilarutkan dengan metanol absolut dan disentrifuge. Digunakan metanol absolut karena tidak mengandung air dan garam tidak dapat larut di dalam pelarut organik. Ekstrak kemudian diuapkan hingga diperoleh ekstrak kasar yang kering.

Ekstrak kasar kemudian dipartisi menggunakan cara ekstraksi cair-cair dalam corong pisah guna mendapatkan ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya, karena prinsip dari ekstraksi cair-cair adalah pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolarannya menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur. Pelarut yang digunakan adalah campuran n-heksan-air (1:1) kemudian dilanjutkan dengan air-kloroform (1:1), sehingga dari hasil partisi ini diperoleh 3 ekstrak yang berbeda kepolarannya, yaitu ekstrak n-heksan yang bersifat non polar, ekstrak kloroform yang bersifat kurang nonpolar dibandingkan ekstrak n- heksan, dan ekstrak air yang bersifat polar. Alasan digunakan pelarut kloroform dan bukannya pelarut lain yaitu dikarenakan pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi cair-cair yang menggunakan 2 pelarut yang tidak saling bercampur, di mana kloroform ini tidak bercampur dengan air yang bersifat polar sedangkan penggunaan pelarut heksan yang bersifat nonpolar juga karena heksan tidak dapat bercampur dengan air.

Tujuan dilakukannya partisi dengan menggunakan 3 pelarut yang berbeda kepolarannya dikarenakan karotenoid yang terkandung dalam alga terbagi dalam 2 kelas yaitu karoten (contohnya β -karoten) yang bersifat nonpolar dan xantofil (contohnya lutein dan zeaxantin) merupakan

turunan teroksidasi dari karoten yang bersifat polar (23), sehingga diharapkan dengan menggunakan 3 pelarut n-heksan, kloroform dan air maka semua senyawa tersebut yang bersifat antioksidan dapat terekstraksi.

Setelah ekstrak telah dipisahkan menurut tingkat kepolarannya maka selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol, dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 515 nm. Nilai analisis probit ditunjukkan dari persen nilai aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH. Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas.

Hasil uji antioksidan yang dilakukan terhadap ketiga ekstrak sampel *Gracillaria arcuata* yang memiliki tingkat kepolaran yang berbeda menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki aktivitas pengikatan terhadap radikal bebas yang amat kecil. Persen pengikatan radikal bebas dari ketiga ekstrak yaitu 33,62% untuk ekstrak heksan, 24,95% untuk ekstrak kloroform, dan 41,07% untuk ekstrak air pada konsentrasi masing-masing yaitu 2000 bpj, sehingga dapat dilihat bahwa ketiga ekstrak tersebut tidak mampu menghambat aktivitas radikal bebas hingga 50%, maka nilai IC_{50} nya tidak dihitung. Sedangkan nilai penghambatan terbesar untuk pembanding β -karoten adalah 79,13% pada konsentrasi 750 bpj. Penggunaan β -karoten sebagai pembanding yaitu dikarenakan sampel

yang diteliti adalah salah satu jenis alga, dimana diketahui alga banyak mengandung berbagai karotenoid yang bersifat sebagai antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas dengan pemutusan ikatan rangkap yang terkonjugasi sehingga sehingga senyawa baru yg terbentuk menjadi tidak reaktif.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, analisis dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa ekstrak alga merah *Gracillaria arcuata* memiliki aktivitas antioksidan dengan persentasi pengikatan terbesar untuk masing-masing ekstrak n-hexan, kloroform, dan air adalah 33,62%, 24,95%, dan 41,07%, lebih kecil jika dibandingkan dengan β -karoten yang memiliki pengikatan radikal bebas sebesar 79,13%.

V.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan dari alga merah spesies yang lain.

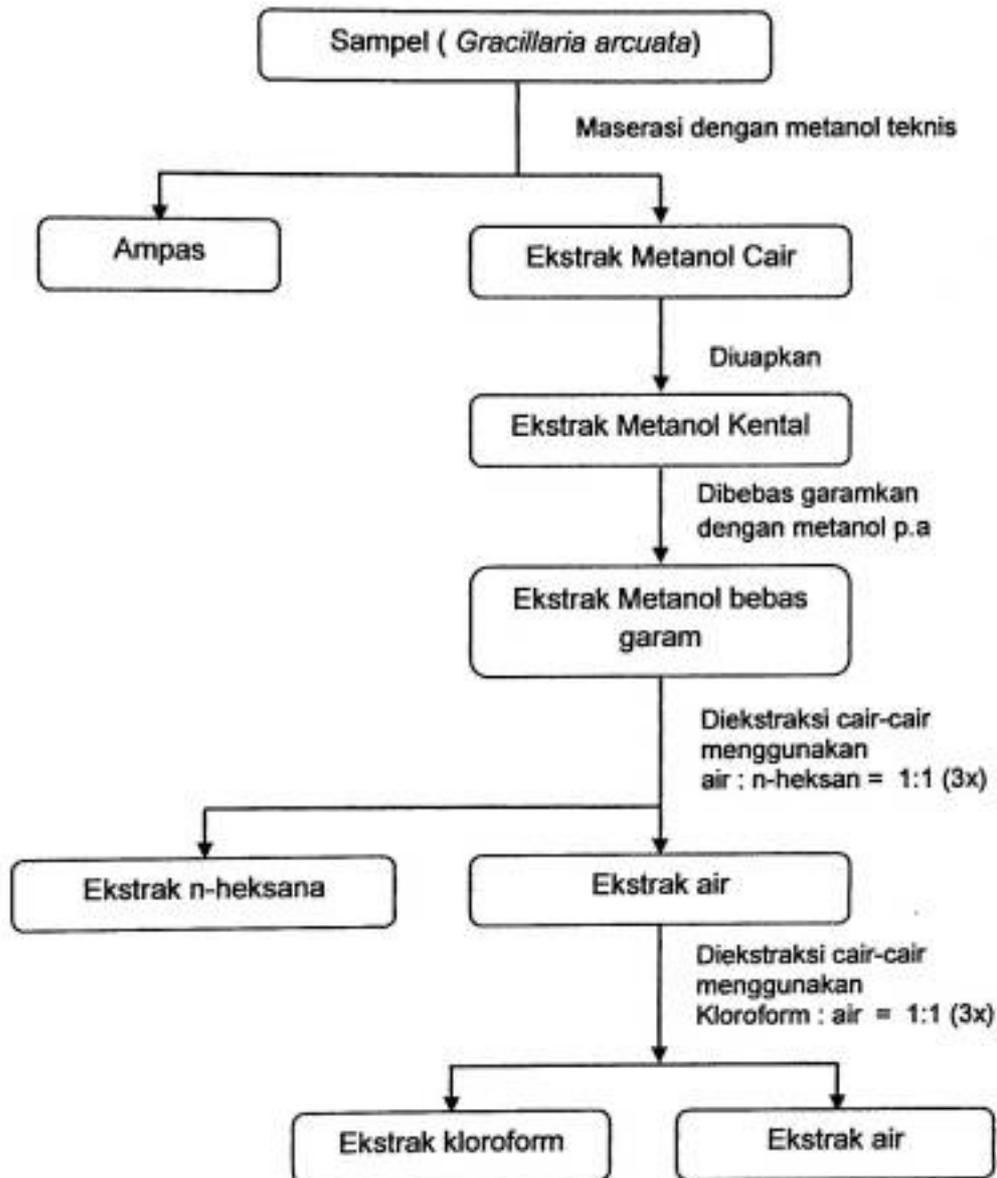
DAFTAR PUSTAKA

1. Suryaningrum, Th., thamrin W. dan Hendy K. *Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dari Rumput Laut Halymenia harveyana dan Euchema cottonii*. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Juni 2006. Vol. 1(1). Hal 52.
2. Tamat, S.R., Wikanta, T., & Maulina, S.L. *Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Ekstrak Rumput Laut Hijau Ulva reticulata Forsskal*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. April 2007 Vol. 5. Hal. 31-3.
3. Winarsi, Hery, W., Dr., M.S. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasinya dalam Kesehatan*. Penerbit Kanisius. Jogyakarta. Hal. 15, 79-81, 264.
4. Romimohtarto, Kasijan dan Sri J. 2007. *BIOLOGI LAUT : Ilmu Pengetahuan tentang Biota Laut*. Penerbit Djambatan: Jakarta.hal 1, 379, 448-9.
5. Xiaojun Yan, et al. *Fucoxanthin as the Major Antioxidant in Hijikia fusiformis, a Common Edible Seaweed*. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 1999;63(3). Hal. 605-6.
6. Aan, Heribertus. 2009. *Kesehatan Prima*. http://www.blogger.com/img/triangle_ltr.gif. Diakses pada tanggal 21 April 2009.
7. Munifah, I., Suryaningrum, D., & Krisnawang, H. 2005. *The Antioxidant Carotenoid Constituent from Marine Macro Algae*. www.pharmacistdkp@yahoo.com, diakses 18 Januari 2009. Hal. 1
8. Anggadiredja, J.T., dkk. 2009. *Rumput Laut*. Penebar Swadaya : Jakarta. Hal 7, 12-3, 20-2, 63-4.
9. Juneidi, W., editor. *Rumput Laut, Jenis dan Morfologinya* [monograph on the internet]. Semarang:2004 [18 Januari 2009]. Available from: www.Scribd.com
10. Putra, E., 2005. *Alga Laut Sebagai Biotarget Industri*. www.chem_is_try.org, diakses pada tanggal 22 Januari 2009.

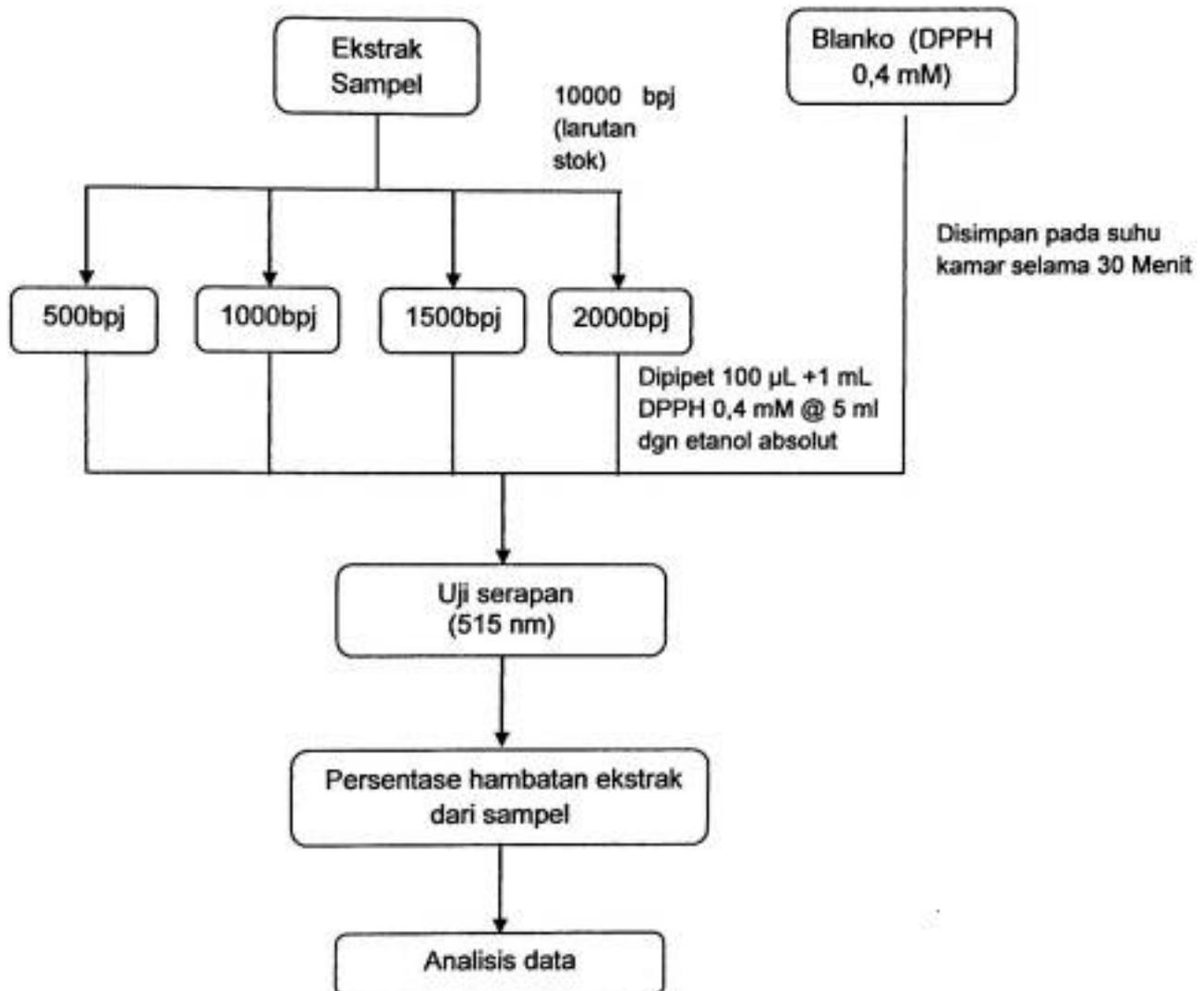
11. Harborne, J.B. 1984. *Metode Fitokimia*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. 1987. Penerbit ITB. Bandung. Hal 6-9, 102-103, 158.
12. Direktorat Jenderal POM. 1986. *Sediaan Galenik*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hal 2,7, 10, 32.
13. Hanani, E., Mun'im, A., & Sekarini, R., 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia* sp dari Kepulauan Seribu. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*. Vol. II. No. 3 :130
14. Sudjadi. 1988. *Metode Pemisahan*. Edisi I. Kanisus. Yogyakarta. Hal 60
15. Gritter, R.J., Bobbitts, J.M. Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata & Iwan Sudiro. Penerbit ITB. Bandung. Hal 6.
16. Blois, MS., 1958, *Antioxidant determination by the use of a stable free radical*, Nature 181. pp 1199-1200.
17. Pokorni, J., Yanishlieva, N., & Gordon, M. 2001. *Antioxidant in Food; Practical Applications*. CRC Press. New York
18. Halliwell, Barry dan John MC Gutteridge,. 1999. *Free Radical in Biology and Medicine 3rd edition*. Oxford University Press. London
19. Catalog and Handbook Of Compound. 1999. *Biochemical and Reagents For Life Science Research*, Sigma-Aldrich, Singapura. pp 1004.
20. Husaini, M.A. 1991. Gizi, Proses Penuaan dan umur Panjang. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran No. 73* : hal 22-23.
21. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. 1997. *Farmakope Indonesia*. Edisi III. Departemen Kesehatan RI. Jakarta. Hal 9
22. Apandi, M., 1984. *Teknologi Buah dan Sayur*. Penerbit Alumni. Bandung. Hal 15.

23. Suwandi, U., 1991. Manfaat Beta Karoten Bagi Kesehatan. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran*. Vol 73: Hal 36-40
24. Budavari, S., 1989. *The Merck Index an Encyclopedia of Chemical and Biological*. Eleventh edition. Merck and Co.Inc. New Jersey. pp 282
25. Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Terjemahan oleh Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. Hal 73.
26. Meyer, B.N. 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituent. *Drug Information Journal*. Vol. 32. pp 513-524.
27. Muhilal. 1991. Teori Radikal Bebas dalam Gizi dan Kedokteran. *Majalah Cermin Dunia Kedokteran* Vol. 73 : 10
28. Sastrohamidjojo, H., 1985. *Spektroskopi*. Penerbit Liberty, Yogyakarta. Hal 11-15
29. Ganzon, E.T., 1988. *Philippine Seaweeds*. National Book Store, Metro Manila Philippine. pp 164-5.

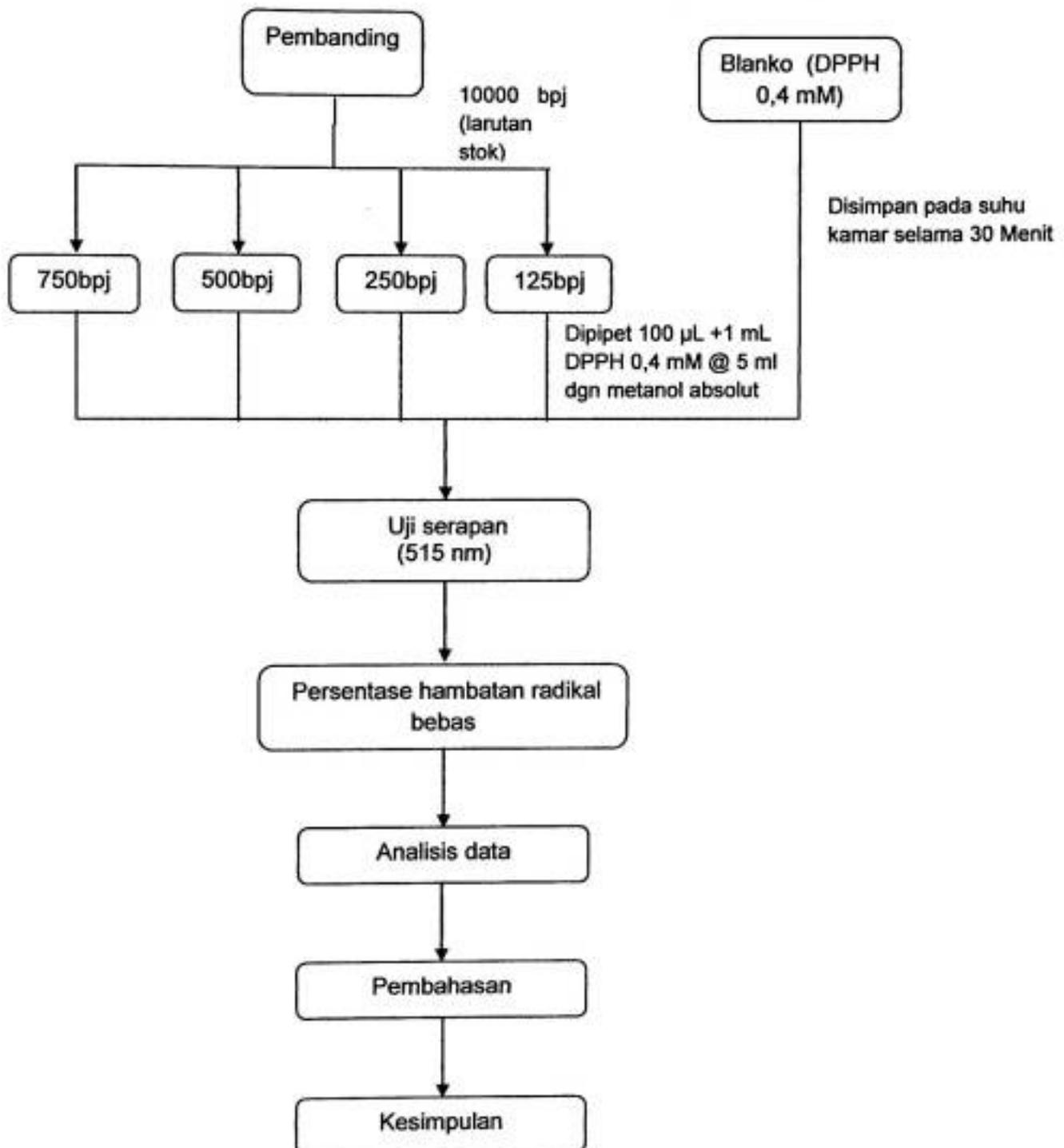
Lampiran 1. Skema Kerja Ekstraksi dan Partisi Alga Merah (*Gracillaria arcuata*)



Lampiran 2. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Alga Merah (*Gracillaria arcuata*) dengan Metode DPPH



Lampiran 3. Skema Kerja Uji Aktivitas Antioksidan Pembanding β - Karoten dengan Metode DPPH



Lampiran 4. Contoh Perhitungan % Pengikatan Radikal bebas

$$\% \text{ pengikatan radikal bebas} = \frac{(\text{Abs.blanko} - \text{Abs.sampel})}{\text{Abs.blanko}} \times 100\%$$

Pada ekstrak n-heksan *Gracillaria arcuata* dengan konsentrasi 2000 μ g/ml

$$= \frac{(0,7129 - 0,4732)}{0,7129} \times 100\%$$

$$= 33,62 \%$$

Tabel 3. Hasil Pengukuran Serapan DPPH yang Tidak Terikat Oleh alga merah *Gracillaria arcuata*

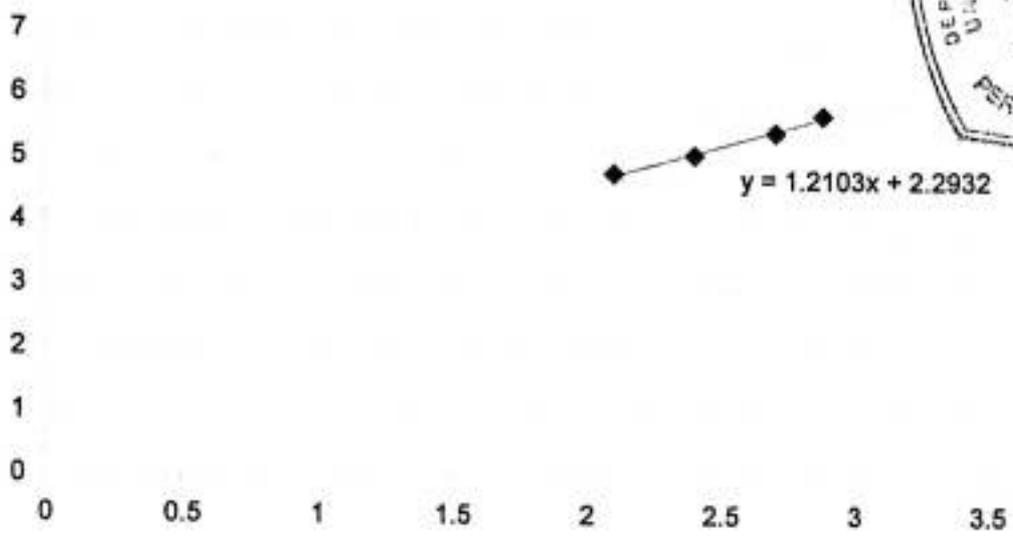
Ekstrak	Konsentrasi (µg/ml)	Serapan	Rata-rata	% Pengikatan Radikal bebas
n-Hexan	2000	0,4680	0,4732	33,62
		0,4740		
		0,4775		
	1500	0,5492	0,5678	21,76
		0,5651		
		0,5591		
	1000	0,6079	0,6127	14,05
		0,6112		
		0,6191		
	500	0,6810	0,6813	4,43
		0,6790		
		0,6838		
Kloroform	2000	0,5339	0,5350	24,95
		0,5371		
		0,5492		
	1500	0,5885	0,5880	17,52
		0,5851		
		0,5903		
	1000	0,6396	0,6353	10,88
		0,6292		
		0,6372		
	500	0,6727	0,6693	6,12
		0,6698		
		0,6655		
Air	2000	0,4104	0,4201	41,07
		0,4224		
		0,4276		
	1500	0,4862	0,4894	31,35
		0,4938		
		0,4882		
	1000	0,5294	0,5370	24,67
		0,5377		
		0,5438		
	500	0,5887	0,6104	14,37
		0,6191		
		0,6235		
Blanko		0,7134	0,7129	
		0,7124		
		0,7128		

Tabel 4. Hasil Pengukuran Serapan DPPH yang Tidak Terikat Oleh β - Karoten

Pembanding	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Serapan	Rata-rata	% Pengikatan Radikal bebas	Serapan Blanko
β -karoten	750	0,16364	0,16861	79,13	0,80806
		0,18735			
		0,15486			
	500	0,24371	0,23962	70,34	
		0,22282			
		0,25235			
	250	0,34617	0,35259	56,36	
		0,34859			
		0,36302			
	125	0,45257	0,44512	44,91	
		0,42778			
		0,45500			

Tabel 5. Hasil Perhitungan IC_{50} β - Karoten

Pembanding	Konsentrasi $\mu\text{g/ml}$	Log Konsentrasi (x)	%pengikatan DPPH	Probit (y)	Persamaan Garis Linear	IC_{50} $\mu\text{g/ml}$
β -karoten	7,5	2,875	79,13	5,81	$y = 2,293 + 1,210 x$ $r = 0,995$	172,65
	5,0	2,699	70,34	5,53		
	2,5	2,398	56,36	5,16		
	1,25	2,097	44,91	4,86		



Gambar 4. Grafik hubungan antara log konsentrasi pembanding β - karoten dengan nilai probit



Gambar 5. *Gracilaria Arcuata* asal Kabupaten Pinrang (foto sendiri)