

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA DARI EKSTRAK
KOMBINASI ALGA COKELAT (*Padina sp.*) DENGAN JERUK NIPIS
(*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

MAGHFIRATUL WAHDANIYAH

H031181003



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2023

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA DARI EKSTRAK
KOMBINASI ALGA COKELAT (*Padina sp.*) DENGAN JERUK NIPIS
(*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar Sarjana Sains*

Oleh

MAGHFIRATUL WAHDANIYAH

H031181003



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA DARI EKSTRAK
KOMBINASI ALGA COKELAT (*Padina sp.*) DENGAN JERUK NIPIS
(*Citrus aurantifolia*), SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIOKSIDAN**

Disusun dan diajukan oleh

MAGHFIRATUL WAHDANIYAH

H031 18 1003

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana
Program Studi Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Universitas Hasanuddin

Pada 24 Januari 2023

dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

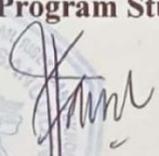
Pembimbing Utama


Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S
NIP. 19601215 198702 2 001

Pembimbing Pertama


Dr. Herlina Rasyid, S.Si
NIP. 19930414 202204 4 001

Ketua Program Studi


Dr. St. Fauziah, M.Si
NIP. 19720202 199903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Maghfiratul Wahdaniyah

NIM : H031181003

Program Studi : Kimia

Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Isolasi dan Karakterisasi Senyawa dari Ekstrak Kombinasi Alga Cokelat (*Padina sp.*) dengan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*), serta Uji Bioaktivitasnya sebagai Antioksidan." adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 24 Januari 2023



Yang Menyatakan,

Maghfiratul Wahdaniyah

PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim,

Syukur *Alhamdulillah* penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan. Sholawat dan salam penulis kirimkan kepada Nabiullah Muhammad SAW, beserta para sahabat dan keluarga beliau yang telah memberikan tauladan dalam menjalani kehidupan di dunia dan di akhirat. Penyusunan skripsi ini dimaksudkan untuk memenuhi sebagian syarat-syarat guna mencapai gelar Sarjana Sains. Terdapat banyak hambatan dan rintangan yang dihadapi oleh penulis dalam penyusunan skripsi ini, namun *Alhamdulillah* pada akhirnya penulis dapat melaluinya berkat adanya bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ayahanda dan Ibunda tercinta **H. Irwan Mahmuddin** dan **St. Nur Irwan** yang telah menemani, mendo'akan, dan meridhoi setiap langkah penulis, serta memberi dukungan finansial kepada penulis. Semoga Allah SWT selalu melindungi dan memberi kebahagiaan kepada kalian di dunia dan di akhirat kelak. Terimakasih kakak tercinta **Alm. Ihza Pratama** dan **Ahmad Yasin** yang selalu menjadi panutan yang juga turut serta dalam membantu pengerjaan skripsi ini, serta selalu memfasilitasi seluruh kebutuhan penulis. Kakak ipar **Qur'ana** dan keponakan tersayang **Muh. Alfatih Yusra** yang selalu memberi semangat kepada penulis serta segenap keluarga besar yang selalu melimpahkan do'a, kasih sayang, dan dukungannya kepada penulis. Semoga

Allah SWT selalu memberikan lindungan kepada mereka semua sekaligus melimpahkan rahmat-Nya kepada kalian, aamiin.

Penulis juga mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Pembimbing utama Ibu **Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S** dan pembimbing pertama Ibu **Dr. Herlina Rasyid, S.Si** yang selalu meluangkan waktu dan pikiran untuk membantu penulis dalam mengerjakan penelitian ini serta dengan sabar membimbing penulis dalam mengerjakan penulisan skripsi ini, kami mengucapkan terima kasih yang tak terhingga untuk beliau.
2. Tim penguji ujian penulis, Ibu **Dr. Seniwati Dali, M.Si** (ketua) dan Ibu **Dr. St. Fauziah, M.Si** (sekretaris), terima kasih banyak atas segala arahan dan saran-saran, serta bimbingan yang telah diberikan.
3. Segenap **Bapak, Ibu Dosen dan Staff Departemen Kimia** kami ucapkan terima kasih telah membimbing dan membagikan ilmunya kepada kami.
4. Seluruh analis laboratorium: **Ibu Tini, Pak Iqbal, Pak Sugeng, Ibu Anti, Ibu Linda, Kak Fiby, Kak Hanna, dan Kak Yura** yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian serta urusan lainnya di Laboratorium.
5. Rekan penelitian sekaligus partner kerja penulis di Laboratorium Kimia Organik: **Fatin, Agung, Cila, Salman, Ibu Dija, Kak Nurul, Kak Musni, Kak Maje, Kak Bahrn, Kak Akbar, Ibu Seren, Pak Kolo, Pak Iwan, Kak Septian, Kak Ebet, Alfi, dan Anrif** terima kasih untuk selalu menemani penulis dari awal pengerjaan hingga akhir penelitian serta selalu memberikan arahan, semangat, dan motivasi kepada penulis.
6. Rekan-rekan Support Sistem penulis **Epi, Depa, Citra, Esry, Lala, Feni, Maya, Ratni, Yana**, terimakasih karena selalu meluangkan waktunya untuk

membantu serta menghibur penulis selama penelitian ini.

7. Teman-teman SMA penulis yang sudah seperti keluarga, Tadika Mesra **Fitriani, Rifqah Fakhriyah Khaeruddin, dan Rahmawati Rahim**, terima kasih karena selalu menjadi tempat curhat penulis. **Dilboy** dan **Puput** yang selalu menjadi teman *deeptalk*, serta segenap anggota **cdar07** yang sampai sekarang masih menjadi teman-teman terbaik penulis.
8. Teman-teman **Kimia 2018** khususnya **H18RIDISASI**, terima kasih untuk selalu bersama dan membantu penulis, baik dalam dunia perkuliahan maupun di dunia organisasi. Terima kasih untuk selalu memberikan dukungan dan semangat kepada penulis. Semoga kekeluargaan dan persahabatan kita tidak berakhir seiring berakhirnya perjalanan kita di Unhas.
9. Organisasi **KMK** dan **orang-orang di dalamnya**, terima kasih untuk segala pelajaran dan pengalaman berharga yang telah diberikan selama penulis berorganisasi.

Penulis sadar akan banyaknya kekurangan dalam penulisan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dalam perbaikan dan penyempurnaannya.

Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat dalam pengembangan wawasan bidang ilmu kimia secara umum.

Makassar, 24 Januari 2023

Penulis,



MAGHFIRATUL WAHDANIYAH

ABSTRAK

Alga cokelat *Padina sp.* merupakan salah satu tumbuhan yang memiliki kelimpahan tinggi di perairan Indonesia namun pemanfaatan senyawa bioaktifnya belum optimal, di sisi lain jeruk nipis *Citrus aurantifolia* telah dikenal akan nutrisi dan manfaatnya bagi kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengombinasikan kedua jenis tumbuhan tersebut untuk melihat perubahan bioaktivitasnya sebagai antioksidan yang diakibatkan dari adanya efek sinergisme ataupun antagonisme oleh senyawa bioaktif dari kedua jenis tumbuhan yang berbeda, serta mengisolasi senyawa dari kombinasi tumbuhan tersebut. Metode yang digunakan diantaranya maserasi bertingkat dengan empat pelarut (*n*-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol), evaporasi, fraksinasi, pemurnian, identifikasi dan karakterisasi senyawa berdasarkan data spektrum FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, serta pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan keempat ekstrak tunggal *Padina sp.* dengan nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol berturut-turut yaitu 179,24; 144,77; 156,26; dan 153,02 µg/mL lebih baik daripada aktivitas antioksidan keempat ekstrak tunggal *Citrus aurantifolia* dengan nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol berturut-turut yaitu 1.536,87; 295,31; 633,58; dan 620,48 µg/mL, sedangkan keempat ekstrak kombinasi *Padina sp.* dan *Citrus aurantifolia* (KPC) menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling lemah diantara ketiga jenis ekstrak tersebut dengan nilai IC₅₀ ekstrak *n*-heksana, etil asetat, aseton, dan metanol berturut-turut yaitu 7.019,38; 794,10; 905,58; dan 841,64 µg/mL yang menandakan bahwa kombinasi kedua jenis tumbuhan *Padina sp.* dan *Citrus aurantifolia* menghasilkan efek antagonisme. Sebanyak 543,50 mg senyawa asam heksadekanoat atau asam palmitat berhasil diisolasi dari ekstrak etil asetat KPC dengan hasil uji bioaktivitas antioksidan yang dikategorikan sangat lemah dengan nilai IC₅₀ yaitu 40.391,16 µg/mL jika dibandingkan dengan nilai IC₅₀ kontrol positif asam askorbat yaitu 3,57 µg/mL.

Kata kunci: alga cokelat (*Padina sp.*), antioksidan, asam palmitat, DPPH, jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), dan kombinasi *Padina sp.* dengan *Citrus aurantifolia*.

ABSTRACT

Brown algae *Padina sp.* is one of the plants that has a high abundance in Indonesian waters, but the use of bioactive compounds is not yet optimal, on the other hand, lime *Citrus aurantifolia* has been known for its nutrition and benefits for health. This study aims to combine the two types of plants to see changes in their bioactivity as antioxidants resulting from the effects of synergism or antagonism by bioactive compounds from two different types of plants, as well as isolating compounds from these plant combinations. The methods used include multilevel maceration with four solvents (*n*-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol), evaporation, fractionation, purification, identification and characterization of compounds based on FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR spectrum data, and antioxidant activity testing using the 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) method. The results of this study showed that the antioxidant activity of the four single extracts of *Padina sp.* with an IC₅₀ value of *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol extracts sequentially of 179,24; 144,77; 156,26; and 153,02 µg/mL was better than the antioxidant activity of all four single extracts of *Citrus aurantifolia* with IC₅₀ values of *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol extracts sequentially i.e. 1.536,87; 295,31; 633,58; and 620,48 µg/mL, while the four extract combinations *Padina sp.* and *Citrus aurantifolia* (KPC) showed the weakest antioxidant activity among the three types of extracts with IC₅₀ values of *n*-hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol extracts sequentially at 7.019,38; 794,10; 905,58; and 841,64 µg/mL indicating that the combination of the two types of plants *Padina sp.* and *Citrus aurantifolia* produces an antagonistic effect. A total of 543,50 mg of hexadecanoic acid or palmitic acid compounds were successfully isolated from KPC ethyl acetate extract with the results of the antioxidant bioactivity test which was categorized as very weak with an IC₅₀ value of 40,391.16 µg/ mL when compared to the IC₅₀ value of ascorbic acid positive control of 3,57 µg/mL.

Keywords : brown algae (*Padina sp.*), antioxidant, palmitic acid, DPPH, lime (*Citrus aurantifolia*), and combination *Padina sp.* with *Citrus aurantifolia*.

DAFTAR ISI

| | halaman |
|---|----------------|
| PRAKATA | v |
| ABSTRAK | viii |
| ABSTRACT | ix |
| DAFTAR ISI..... | x |
| DAFTAR TABEL..... | xiii |
| DAFTAR GAMBAR | xiv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvi |
| DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN..... | xvii |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 6 |
| 1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian..... | 6 |
| 1.3.1 Maksud Penelitian..... | 6 |
| 1.3.2 Tujuan Penelitian | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 7 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 8 |
| 2.1 Senyawa Antioksidan..... | 8 |
| 2.2 Deskripsi Alga Cokelat <i>Padina sp.</i> | 11 |
| 2.2.1 Bioaktivitas Alga Cokelat <i>Padina sp.</i> | 13 |
| 2.3 Deskripsi Jeruk Nipis <i>Citrus aurantifolia</i> | 14 |
| 2.3.1 Bioaktivitas Jeruk Nipis <i>Citrus aurantifolia</i> | 16 |

| | |
|--|-----------|
| 2.4 Bioaktivitas Kombinasi Tumbuhan..... | 18 |
| 2.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode DPPH | 21 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 24 |
| 3.1 Bahan Penelitian..... | 24 |
| 3.2 Alat Penelitian | 24 |
| 3.3 Waktu dan Tempat Penelitian | 25 |
| 3.4 Prosedur Penelitian..... | 25 |
| 3.4.1 Preparasi Sampel..... | 25 |
| 3.4.2 Uji Pendahuluan Rendemen Masing-masing Sampel..... | 25 |
| 3.4.3 Ekstraksi Kombinasi <i>Padina sp.</i> dengan <i>Citrus Aurantifolia</i> (KPC)..... | 26 |
| 3.4.4 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder..... | 26 |
| 3.4.4.1 Uji Alkaloid..... | 27 |
| 3.4.4.2 Uji Flavonoid | 27 |
| 3.4.4.3 Uji Tanin | 27 |
| 3.4.4.4 Uji Terpenoid/Steroid..... | 27 |
| 3.4.4.5 Uji Saponin | 27 |
| 3.4.5 Fraksinasi dan Pemurnian | 28 |
| 3.4.6 Karakterisasi Senyawa | 28 |
| 3.4.6.1 Penentuan Titik Leleh | 28 |
| 3.4.6.2 Penentuan Struktur Kimia..... | 29 |
| 3.4.7 Uji Bioaktivitas Antioksidan dengan Metode 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl DPPH (Brand dkk., 1995 dimodifikasi). | 29 |
| 3.4.7.1 Pembuatan Larutan DPPH 0,40 mM..... | 30 |
| 3.4.7.2 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 3.4.7.3 Pengukuran Daya Antioksidan Sampel..... | 30 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 32 |
| 4.1 Preparasi Sampel..... | 32 |
| 4.2 Uji Pendahuluan Rendemen Masing-masing Sampel | 32 |
| 4.3 Ekstraksi Kombinasi <i>Padina sp.</i> dengan <i>Citrus aurantifolia</i> (KPC) | 33 |
| 4.4 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Ekstrak KPC. | 35 |
| 4.5 Fraksinasi dan Pemurnian | 36 |
| 4.6 Karakterisasi Senyawa | 42 |
| 4.6.1 Penentuan Titik Leleh | 42 |
| 4.6.2 Identifikasi Golongan Senyawa Metabolit Sekunder Isolat A1 | 43 |
| 4.6.3 Analisis Gugus Fungsi Isolat A1 menggunakan FT-IR ... | 43 |
| 4.6.4 Analisis Jumlah C dan H Isolat A1 menggunakan NMR | 45 |
| 4.7 Uji Bioaktivitas Antioksidan Ekstrak dan Isolat KPC | 48 |
| 4.7.1 Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH 0,40 mM | 49 |
| 4.7.2 Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH. | 50 |
| BAB V KESIMPULAN DAN SARAN..... | 60 |
| 5.1 Kesimpulan | 60 |
| 5.2 Saran..... | 60 |
| DAFTAR PUSTAKA | 62 |
| LAMPIRAN..... | 70 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | halaman |
|--|----------------|
| 1. Aktivitas antioksidan alga cokelat <i>Padina sp.</i> | 20 |
| 2. Aktivitas antioksidan jeruk nipis <i>Citrus aurantifolia</i> | 20 |
| 3. Tingkat kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC ₅₀ | 22 |
| 4. Berat ekstrak uji pendahuluan dan konversi serbuk masing-masing sampel yang digunakan | 32 |
| 5. Rendemen hasil ekstraksi KPC | 34 |
| 6. Hasil skrining fitokimia ekstrak KPC | 35 |
| 7. Berat fraksi KKV ekstrak etil asetat..... | 39 |
| 8. Data spektrum FT-IR isolat A1 dan perbandingannya dengan referensi | 45 |
| 9. Data spektrum ¹ H-NMR dan ¹³ NMR isolat A1 serta perbandingannya dengan referensi | 47 |
| 10. Hasil pengukuran bioaktivitas antioksidan | 53 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | halaman |
|---|---------|
| 1. Bentuk alga cokelat <i>Padina sp.</i> | 12 |
| 2. Struktur fukosantin..... | 14 |
| 3. Bentuk jeruk nipis <i>Citrus aurantifolia</i> | 15 |
| 4. Struktur hesperidin (A), neohesperidin (B), rutin (C), dan narigin (D) | 17 |
| 5. Struktur 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) | 21 |
| 6. Reaksi antara radikal bebas 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) dengan senyawa antioksidan | 22 |
| 7. Kromatogram ekstrak <i>n</i> -heksana (a), etil asetat (b), aseton (c), dan metanol (d) menggunakan eluen etil asetat dan <i>n</i> -heksana (1,50 : 8,50) setelah elusi dan tampak di bawah lampu UV 245 nm (1), di bawah lampu UV 365 nm (2), serta setelah disemprotkan Ce(SO ₄) ₂ dan dipanaskan (3) | 37 |
| 8. Kromatogram ekstrak etil asetat eluen etil asetat : <i>n</i> -heksana (1,50 : 8,50) (a) dan eluen etil asetat : <i>n</i> -heksana (0,25 : 9,75)..... | 38 |
| 9. Kromatogram fraksi KKV ekstrak etil asetat elusi 1 (fraksi 1-25) menggunakan eluen etil asetat : <i>n</i> -heksana (1,50 : 8,50) dan elusi 2 (fraksi 24-50) menggunakan eluen etil asetat : <i>n</i> -heksana (5 : 5) | 39 |
| 10. Padatan fraksi A (a) dan KLT padatan fraksi A eluen etil asetat : <i>n</i> - heksana (1 : 9) (b) | 40 |
| 11. Ekstraksi cair-cair menggunakan <i>n</i> -heksana (1) dan metanol (2)..... | 41 |
| 12. Rekristalisasi padatan A1 menggunakan <i>n</i> -heksana | 41 |
| 13. KLT satu dimensi menggunakan eluen etil asetat : <i>n</i> -heksana (0,30 : 9,70) (a ₁), eluen aseton : <i>n</i> -heksana (1 : 9) (a ₂), eluen etil asetat : kloroform (1 : 9) (a ₃), dan KLT dua dimensi menggunakan eluen aseton : <i>n</i> -heksana (1 : 9) (b) isolat A1 | 42 |
| 14. Isolat A1 | 43 |
| 15. Spektrum FT-IR isolat A1 | 44 |

| | |
|---|----|
| 16. Spektrum ^{13}C -NMR isolat A1 | 46 |
| 17. Spektrum ^1H -NMR isolat A1 | 46 |
| 18. Struktur asam heksadekanoat atau asam palmitat..... | 48 |
| 19. Spektrum panjang gelombang maksimum DPPH 0,40 mM | 49 |
| 20. Persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak tunggal <i>n</i> -heksana, etil asetat, aseton, dan metanol <i>Padina sp.</i> | 51 |
| 21. Persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak tunggal <i>n</i> -heksana, etil asetat, aseton, dan metanol <i>Citrus aurantifolia</i> | 51 |
| 22. Persen (%) aktivitas antioksidan ekstrak <i>n</i> -heksana, etil asetat, aseton, dan metanol KPC (kombinasi <i>Padina sp.</i> dengan <i>Citrus aurantifolia</i>) | 52 |
| 23. Grafik perbandingan nilai IC_{50} dari ketiga jenis ekstrak pada masing-masing pelarut ekstraksi..... | 55 |
| 24. Persen (%) aktivitas antioksidan isolat A1 (Asam palmitat) | 56 |
| 25. Reaksi isolat A1 (Asam palmitat) dengan DPPH | 57 |
| 26. Persen (%) aktivitas antioksidan kontrol positif (Asam askorbat)..... | 57 |
| 27. Reaksi kontrol positif (Asam askorbat) dengan DPPH..... | 59 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | halaman |
|-----------------------------------|----------------|
| 1. Bagan alir penelitian | 70 |
| 2. Bagan prosedur penelitian..... | 71 |
| 3. Perhitungan | 77 |
| 4. Spektrum FT-IR | 92 |
| 5. Dokumentasi Penelitian | 93 |

DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN

| | |
|---------------------|---|
| KPC | : Kombinasi <i>Padina sp.</i> dengan <i>Citrus aurantifolia</i> |
| DPPH | : 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl |
| IC ₅₀ | : <i>Inhibition Concentration</i> |
| EC ₅₀ | : <i>Efficient Concentration</i> |
| KKV | : Kromatografi Kolom Vakum |
| KLT | : Kromatografi Lapis Tipis |
| R _f | : <i>Retention Factor</i> |
| UV-Vis | : <i>Ultraviolet-Visible</i> |
| FT-IR | : <i>Fourier Transform-Infra Red</i> |
| NMR | : <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| ¹ H-NMR | : <i>Proton-Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| ¹³ C-NMR | : <i>Carbon-Nuclear Magnetic Resonance</i> |
| δ | : Geseran Kimia |
| <i>t</i> | : <i>triplet</i> |
| <i>p</i> | : <i>pentet</i> |
| <i>m</i> | : <i>multiplet</i> |
| <i>J</i> | : Konstanta Kopling |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas dalam jumlah normal bermanfaat bagi kesehatan seperti membunuh bakteri, mengatasi peradangan, dan mengontrol tonus otot polos pembuluh darah. Sebaliknya, radikal bebas yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif dalam tubuh manusia sehingga memicu kerusakan oksidatif dari tingkat sel, jaringan, hingga ke organ tubuh yang mempercepat terjadinya proses penuaan dan berbagai penyakit, salah satunya yaitu kanker. Sifat reaktif dari radikal bebas disebabkan oleh adanya satu atau lebih elektron tidak berpasangan yang membuat senyawa tersebut mudah tertarik pada medan magnetik (paramagnetik) (Yuslianti, 2018). Kereaktifan radikal bebas tersebut dapat diredam oleh senyawa antioksidan dengan cara mendonorkan satu atau lebih elektron pada senyawa radikal bebas (Zubia dkk., 2007).

Antioksidan merupakan komponen kimia yang mampu bertahan melawan radikal bebas dengan cara mendonorkan proton (Fitriana dkk., 2016). Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas secara alami karena dapat memproduksi antioksidan namun dalam jumlah yang terbatas sehingga tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh dalam jumlah yang berlebih (Dwimayasanti, 2018). Tubuh manusia tidak memiliki cadangan antioksidan yang besar sehingga jika terjadi paparan radikal bebas yang berlebihan maka tubuh membutuhkan antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogen). Berdasarkan sumbernya, antioksidan eksogen dibedakan menjadi dua jenis, yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami. Beberapa jenis antioksidan sintetik telah

dijinkan penggunaannya dalam produk pangan diantaranya, Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluene (BHT), Propil Galat (PG), Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ), dan Analog Alfa Tokoferol (AAT) (Kumar dkk., 2008). Penggunaan antioksidan sintetik tersebut tetap harus diwaspadai terutama terkait dengan dosis penggunaannya karena overdosis ataupun penggunaan jangka panjang dapat menyebabkan efek samping yang berbahaya seperti merusak hati dan bersifat karsinogenik, sehingga perlu dicari sumber antioksidan alami yang relatif aman untuk digunakan. Salah satu sumber antioksidan alami adalah rumput laut (Dwimayasanti, 2018).

Rumput laut atau alga merupakan salah satu sumber daya hayati yang melimpah di perairan Indonesia yaitu sekitar 8,6% dari total biota di laut (Suparmi dan Sahri, 2008). Alga mengandung senyawa polifenol yang dapat berperan sebagai antioksidan karena senyawa ini bersifat sebagai pereduksi atau agen pendonor hidrogen (Nursid dkk., 2013). Berdasarkan komposisi kimianya, alga diklasifikasikan menjadi tiga kelompok besar, yaitu alga hijau (*Chlorophyta*), alga merah (*Rhodophyta*), dan alga cokelat (*Phaeophyta*) (Nursid dkk., 2013).

Alga cokelat merupakan sumber daya alam laut yang sangat melimpah dengan kurang lebih 134 spesies yang tumbuh secara alami di perairan pesisir Indonesia (Limantara dan Heriyanto, 2011). Salah satu spesies alga cokelat yaitu *Padina sp.* diketahui berpotensi sebagai antioksidan alami (Salosso dan Yudiana, 2018) dengan kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, tanin, fenolat, steroid, saponin (Sari dkk., 2016). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Akbar dkk. (2020) melaporkan bahwa alga cokelat *Padina sp.* memiliki aktivitas antioksidan kategori sedang dengan nilai IC₅₀ untuk ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol berturut-turut yaitu 117,36; 115,71; dan 116,83 µg/mL yang diuji

dengan menggunakan metode 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH). Selain pada tumbuhan laut seperti alga, senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan juga banyak ditemukan pada tumbuhan darat, salah satunya pada buah jeruk (Fejzic dan Cavar, 2014).

Jeruk menjadi salah satu tumbuhan komersial yang paling banyak ditanam di dunia karena sifat nutrisi dan manfaatnya bagi kesehatan. Buah jeruk bersifat bioaktif, diantaranya sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, analgesik, dan antiinflamasi karena tumbuhan jeruk kaya akan asam askorbat dan senyawa bioaktif lainnya seperti kumarin, karotenoid, limonoid, dan flavonoid (khususnya polimetoksisflavon dan flavanon) (Pallavi dkk., 2017).

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) merupakan spesies dari genus *Citrus* yang banyak dikonsumsi karena kandungan antioksidannya yang tinggi. Aktivitas antioksidan *Citrus aurantifolia* ditunjukkan dengan adanya metabolit sekunder seperti minyak atsiri dan golongan flavonoid (Herlina dkk., 2020). Beberapa aktivitas ekstrak *Citrus aurantifolia* sebagai antioksidan terhadap radikal bebas DPPH telah dilaporkan bahwa pada ekstrak etanol daun memiliki nilai IC_{50} sebesar 76,90 $\mu\text{g/mL}$ (Reddy, 2012), ekstrak etanol kulit yaitu 54,46 $\mu\text{g/mL}$ (Khasanah dkk., 2014), pada air perasan jeruk nipis sebesar 55,99 $\mu\text{g/mL}$ (Solichah, 2018), dan ekstrak metanol buah jeruk nipis utuh (campuran sari buah dan kulitnya) memiliki nilai IC_{50} sebesar 1.793,06 g/mL (Khadijah dkk., 2021).

Beberapa penelitian telah dikembangkan agar dapat meningkatkan bioaktivitas dari tumbuhan salah satunya dengan melakukan pencampuran atau kombinasi tumbuhan. Penggunaan kombinasi tumbuhan dalam beberapa penelitian menunjukkan efek terapeutik yang lebih efektif daripada penggunaan satu komponen tumbuhan saja (Halimatussa'diah dkk., 2014). Kombinasi kedua jenis

tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan tersebut menghasilkan aktivitas antioksidan total yang lebih tinggi atau dikenal dengan sebutan efek sinergisme. Penggunaan kombinasi herbal (poliherbal) telah digunakan dalam praktik medis selama ribuan tahun untuk meningkatkan efek terapeutik. Beberapa tumbuhan bertindak sinergis dengan yang lain dan beberapa memiliki efek pelengkap terhadap tumbuhan lain (Badejo dkk., 2014; Wasito dkk., 2011). Kombinasi tersebut diklaim dapat mengurangi efek samping yang tidak diinginkan, seperti insiden keracunan yang lebih rendah dibandingkan dengan hanya menggunakan satu tumbuhan. Namun secara teori, kombinasi bahan kimia aktif pada beberapa tumbuhan juga dapat berinteraksi lebih toksik jika dibandingkan dengan hanya menggunakan satu jenis tumbuhan atau dikenal efek antagonis (Halimatussa'diah dkk., 2014).

Beberapa penggabungan atau kombinasi ekstrak tumbuhan menunjukkan adanya peningkatan bioaktivitas jika dibandingkan dengan hasil pengujian tanpa kombinasi dengan tumbuhan lain. Penelitian Septiawan dkk. (2020) menggabungkan ekstrak alga hijau (*Ulva lactuca* L.) dan lidah buaya (*Aloe vera* L.) serta melakukan uji aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak tersebut. Nilai IC_{50} kombinasi ekstrak lidah buaya dan alga hijau yang diperoleh yaitu 16,51 $\mu\text{g/mL}$ lebih rendah dibandingkan nilai IC_{50} ekstrak tunggal lidah buaya sebesar 64,81 $\mu\text{g/mL}$ dan ekstrak tunggal alga hijau sebesar 21,34 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa pengombinasian ekstrak tumbuhan tersebut dapat meningkatkan bioaktivitas jika dibandingkan tanpa adanya kombinasi.

Pengembangan kombinasi tumbuhan juga dilakukan dengan mencampurkan simplisia atau serbuk tumbuhan sebelum diekstraksi. Penelitian yang dilakukan Afifah (2015) menggabungkan 3 simplisia tumbuhan (yaitu

jeringau, temu manga, dan bawang putih) dengan 3 varian komposisi yang diekstraksi menggunakan etanol dan diuji aktivitas antioksidannya. Nilai IC₅₀ ketiga variasi komposisi tersebut yaitu 61,75; 42,76; dan 47,94 µg/mL lebih rendah jika dibandingkan dengan nilai IC₅₀ dari tumbuhan jeringau, temu mangga, dan bawang putih berturut-turut yaitu 349,24 µg/mL (Wati, 2019); 99,33 µg/mL (Mutmainnah, 2015), dan 10,61 mg/mL (Prasanto dkk., 2017). Hal ini menunjukkan bahwa kombinasi ketiga tumbuhan tersebut menimbulkan aktivitas yang sinergis (Afifah, 2015).

Kombinasi tumbuhan dapat dilakukan dengan cara membandingkan aktivitas dari beberapa variasi komposisi masing-masing ekstrak, seperti pada penelitian yang dilakukan oleh Sambodo (2019) yang mengombinasikan ekstrak alga merah (*Eucheuma cottoni*) dan ekstrak kulit buah lemon (*Citrus limon* L.) dengan perbandingan ekstrak yaitu 1:1, 2:1, dan 1:2. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa pada perbandingan 1:2 merupakan kombinasi yang menghasilkan bioaktivitas yang paling baik. Penggunaan komposisi ekstrak tersebut dapat dikonversikan pada komposisi serbuk yang akan digunakan dengan cara menghitung berat rendemen ekstrak yang diperoleh dari uji pendahuluan masing-masing tumbuhan sehingga ekstrak kombinasi yang dihasilkan dapat menghasilkan komposisi yang optimum yaitu 1:2.

Berdasarkan pada latar belakang tersebut, maka penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi, mengarakterisasi, dan menguji aktivitas antioksidan senyawa organik yang terkandung dalam ekstrak kombinasi alga cokelat (*Padina sp.*) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Kedua tumbuhan tersebut masing-masing memiliki aktivitas antioksidan kategori sedang.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. golongan senyawa metabolit sekunder apa yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*?
2. bagaimana struktur senyawa yang berhasil diisolasi dari ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*?
3. bagaimana hubungan aktivitas antioksidan ekstrak tunggal, ekstrak kombinasi, dan isolat dari kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*, mengetahui struktur senyawa yang berhasil diisolasi dari ekstrak kombinasi, serta menentukan efek kombinasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak dan isolat dari alga cokelat *Padina sp.* dan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. mengidentifikasi golongan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*.
2. mengisolasi dan mengelusidasi struktur senyawa yang ada pada ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*.
3. menguji aktivitas antioksidan ekstrak tunggal, ekstrak kombinasi, dan isolat dari ekstrak kombinasi alga cokelat *Padina sp.* dengan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberi informasi mengenai hubungan aktivitas antioksidan senyawa yang terdapat pada ekstrak tunggal, ekstrak kombinasi, dan isolat yang dihasilkan dari ekstraksi hingga proses isolasi kombinasi simplisia alga cokelat *Padina sp.* dan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat memberi informasi mengenai cara mengisolasi dan mengarakterisasi senyawa dari bahan alam.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa Antioksidan

Radikal bebas bersifat reaktif sehingga mudah bereaksi dengan molekul lain untuk mencapai kestabilan. Sifat reaktif tersebut disebabkan oleh adanya elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluar dari suatu molekul ataupun senyawa (Simanjuntak, 2012). Adanya satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan membuat senyawa mudah tertarik pada medan magnetik (paramagnetik) dan membuat senyawa tersebut sangat reaktif. Reaksi radikal bebas sangat reaktif karena dapat membentuk senyawa radikal bebas baru yang jika senyawa radikal baru tersebut bereaksi dengan senyawa lain maka akan terbentuk senyawa radikal baru dan hal ini terus terjadi atau biasa disebut dengan reaksi berantai (*chain reaction*) (Yuslianti, 2018).

Reaksi berantai radikal bebas dapat diredam oleh senyawa antioksidan dengan cara mendonorkan satu atau lebih elektron pada senyawa radikal bebas tersebut atau biasa disebut sebagai reduktor. Antioksidan dapat memotong proses propagasi (pemanjangan rantai radikal bebas) dengan cara mencegah oksidasi suatu molekul menjadi radikal bebas yang akan menghentikan reaksi berantai agar tidak menjadi reaktif dan merusak sistem di dalam tubuh (Fajarwati, 2013).

Antioksidan (AH) berfungsi sebagai pemberi atom hidrogen. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ($R\bullet$) atau mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil, sementara itu turunan radikal antioksidan ($A\bullet$) memiliki keadaan lebih stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain untuk membentuk radikal lipida

baru. Menurut Asda (2009) reaksi umum antara radikal bebas dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada persamaan (1):



Tubuh manusia tidak mampu menghasilkan senyawa antioksidan dalam jumlah besar sehingga jika terjadi paparan radikal bebas berlebih, tubuh memerlukan senyawa antioksidan eksogen (Puspitasari dan Indah, 2016). Winarsih (2007) menggolongkan secara umum antioksidan menjadi dua yaitu:

- a. Antioksidan enzimatis seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathion peroksidase.
- b. Antioksidan non-enzimatis yang digolongkan ke dalam 2 kelompok, yaitu:
 - Larut lemak seperti tokoferol, karatenoid, flavonoid, dan quinon.
 - Larut air seperti asam askorbat (Vitamin C), asam urat, protein pengikat logam, dan protein pengikat heme.

Selain itu, Winarsih (2007) juga menggolongkan antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya menjadi tiga kelompok, yaitu:

- a. Antioksidan primer

Antioksidan primer atau biasa disebut antioksidan enzimatis adalah senyawa yang mampu dengan cepat memberikan atom hidrogen kepada senyawa radikal bebas sehingga berubah menjadi senyawa stabil. Antioksidan primer juga dapat mencegah pembentukan radikal bebas baru dengan memutus reaksi berantai.

- b. Antioksidan sekunder

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogen atau non-enzimatis.

Mekanisme kerjanya dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai radikal bebas atau dengan menangkapnya sehingga efek negatif radikal bebas bisa dicegah.

c. Antioksidan tersier

Enzim DNA repair dan metionin sulfoksida reduktase merupakan kelompok antioksidan tersier. Enzim-enzim ini berfungsi sebagai perbaikan biomolekuler sel yang rusak akibat efek radikal bebas.

Selain kedua penggolongan antioksidan tersebut, Isnindar dkk. (2011) juga menggolongkan antioksidan berdasarkan sumbernya yaitu:

a. Antioksidan alami

Antioksidan alami merupakan jenis antioksidan yang berasal dari tumbuhan dan hewan. Antioksidan alami umumnya mempunyai gugus hidroksil dalam struktur molekulnya. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik polifungsional. Senyawa kimia tergolong antioksidan dan dapat ditemukan secara alami diantaranya adalah asam ellagit, proantosianidin, polifenol, karotenoid, tokoferol, dan glutathion.

b. Antioksidan sintetik

Antioksidan sintetik adalah jenis antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia dan diproduksi untuk tujuan komersial. Antioksidan sintetik yang diizinkan dan umum digunakan untuk makanan yaitu BHA (*Butylated Hydroxy Anisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*), dan propil galat.

Penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi saat ini karena beberapa antioksidan tersebut telah terbukti bersifat karsinogenik dan beracun terhadap

hewan uji. Penggunaan antioksidan sintetis BHA dan BHT telah dilaporkan menyebabkan keracunan dalam dosis tertentu dan menurut rekomendasi *Food dan Drug Administration*, dosis antioksidan sintetis yang diperbolehkan dalam makanan adalah 0,01%-0,1% (Panagan, 2011).

Beberapa senyawa antioksidan sintetis telah menunjukkan sifat toksik ataupun efek mutagenik, hal ini membuat peneliti tertarik untuk mencari antioksidan alami yang aman untuk dikonsumsi. Senyawa antioksidan di dalam tumbuhan bersifat sebagai penerima radikal bebas yang dapat bermanfaat sebagai agen terapi pada beberapa penyakit yang disebabkan karena stres oksidatif (Pallavi dkk., 2017).

2.2 Deskripsi Alga Cokelat *Padina sp.*

Alga merupakan kelompok tumbuhan yang hidup di perairan laut, baik itu perairan dangkal maupun perairan dalam yang masih terkena sinar matahari. Alga merupakan jenis tumbuhan tingkat rendah dengan bentuk tubuh yang tidak memiliki akar, batang, dan daun sejati. Beberapa alga memiliki ukuran yang sangat kecil atau disebut mikroalga dan beberapa memiliki ukuran yang besar atau disebut makroalga. Makroalga diklasifikasikan berdasarkan kandungan warna yang paling mencolok sehingga dapat menutupi warna lain yang terkandung di dalamnya, yaitu *Cyanophyta* (alga hijau-biru), *Chlorophyta* (alga hijau), *Rhodophyta* (alga merah), dan *Phaeophyta* (alga cokelat) (Kasim, 2016).

Alga cokelat, yang dikenal sebagai *filum Phaeophyta*, hidup di air laut terutama yang bersuhu agak dingin hingga sedang, dan daun berbentuk seperti benang ataupun lembaran yang dapat mencapai puluhan meter. Warna cokelat pada *filum* ini ditimbulkan oleh adanya pigmen cokelat (fukosantin) yang secara dominan menyelubungi warna hijau dari klorofil pada jaringan. Selain fukosantin,

alga cokelat juga mengandung pigmen lain seperti klorofil-a, klorofil-c, violasantin, β -karoten, dan diadinosantin (Husni dan Budhiyanti, 2021).

Salah satu alga cokelat yang tersebar luas di perairan Indonesia adalah *Padina sp.* (Gambar 1). Alga cokelat *Padina sp.* berbentuk lembaran dengan warna dominan cokelat dan memiliki persediaan makanan (hasil fotosintesis) berupa laminaran (Husni dan Budhiyanti, 2021).



Gambar 1. Bentuk alga cokelat *Padina sp.* (pixgood.com)

Menurut Romimohtarto dan Juwana (2007), habitat dari *Padina sp.* di laut pada daerah intertidal dan biasanya menempel pada bebatuan di daerah rata-rata terumbu karang baik di daerah terbuka maupun di tempat tertutup. Talus *Padina sp.* berbentuk lembaran dengan jari-jari sekitar 4-5 cm yang ujungnya membulat dan mengalami penebalan *gametangia* yang berfungsi untuk melindungi talus agar tidak mudah robek. Pada bagian talus, terdapat garis-garis konsentris yang berwarna putih. Klasifikasi *Padina sp.* menurut Trihatmoko (2015) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Phaeophyta
Kelas : Phaeophyceae

Ordo : Dictyotales
Famili : Dictyotaceae
Genus : *Padina*
Spesies : *Padina sp.*

2.2.1 Bioaktivitas Alga Cokelat *Padina sp.*

Wijayanti dkk. (2020) melaporkan bahwa *Padina* dari Kepulauan Poteran Madura mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, steroid, saponin, tanin, dan alkaloid. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian lainnya mengenai *Padina* yang dilaporkan mengandung senyawa fenol, flavonoid (Handayani dan Zuhrotun, 2017), alkaloid, triterpenoid, saponin, tanin, dan fenol hidrokuinon (Haryani dkk., 2014).

Beberapa senyawa kimia yang berhasil diisolasi dari ekstrak talus *Padina* diantaranya pada ekstrak *n*-heksana, ditemukan senyawa asam lemak dan senyawa triterpenoid, sedangkan pada ekstrak etil asetat ditemukan senyawa asam lemak dengan ikatan rangkap dua terkonjugasi dan senyawa steroid. Pada ekstrak metanol talus *Padina* diperoleh fukosterol dan dua senyawa steroid-triterpenoid, sedangkan pada ekstrak air telah diisolasi natrium alginat (Suganda dkk., 2007).

Padina sp. merupakan salah satu spesies alga cokelat yang dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan (Salosso dan Yudiana, 2018). Hal tersebut juga dibuktikan oleh Akbar dkk. (2020) yang melaporkan bahwa alga cokelat *Padina sp.* memiliki aktivitas antioksidan kategori sedang dengan nilai IC₅₀ untuk ekstrak *n*-heksana, etil asetat, dan metanol berturut-turut 117,36; 115,71; dan 116,83 µg/mL. Potensi aktivitas *Padina sp.* sebagai antioksidan dikaitkan dengan kandungan senyawa yang mampu menangkap radikal bebas dengan prinsip dari



Gambar 3. Bentuk jeruk nipis *Citrus aurantifolia* (Nurul, 2021)

Morfologi tumbuhan jeruk nipis yaitu akar, batang, daun, buah, dan bunga. Sistem perakaran jeruk nipis adalah akar tunggang, selain itu jeruk nipis memiliki batang yang tergolong dalam batang berkayu (lignosus), yaitu batang yang biasanya keras dan kuat karena sebagian besar tergolong kayu (Boekoesoe dan Jusuf, 2015). Daun jeruk nipis berwarna hijau dan jika sudah tua warna kulitnya menjadi kuning dengan helaian daun berbentuk jorong, pangkal bulat, ujung tumpul, tepi beringgi, dan permukaan atas berwarna hijau tua mengkilap. Jeruk nipis memiliki bunga berwarna agak kemerahan hingga keunguan yang berbau harum karena banyak mengandung nektar (madu) yang muncul dari ketiak-ketiak daun atau pucuk-pucuk ranting yang masih muda. Bagian morfologi jeruk nipis yang terakhir yaitu buah jeruk nipis berbentuk bola bewarna kuning setelah tua atau masak dan bewarna hijau ketika masih muda dengan diameter 3,5-5 cm. Pada kulit buah jeruk nipis mengandung semacam minyak atsiri yang berasa pahit. Minyak tersebut sangat mudah membentuk senyawa dengan alkohol, eter, dan minyak lemak tetapi sulit larut dalam air (Liana, 2017). Klasifikasi buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menurut Ramadhianto (2017) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Subdivisio : Angiospermae
Kelas : Dicotyledonae
Ordo : Rutales
Famili : Rutaceae
Genus : *Citrus*
Spesies : *Citrus aurantifolia*

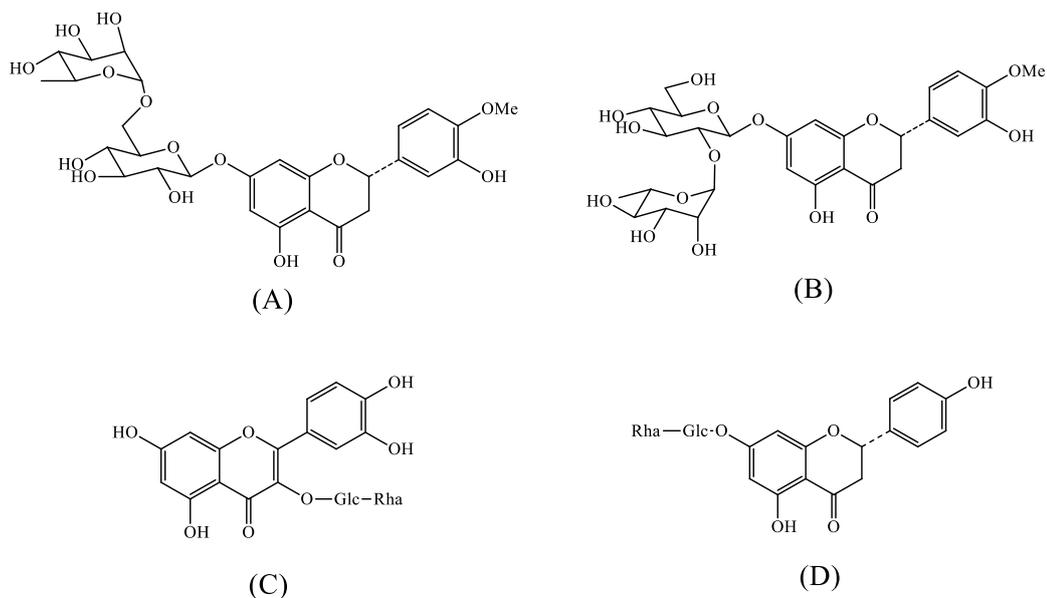
2.3.1 Bioaktivitas Jeruk Nipis *Citrus aurantifolia*

Genus *Citrus* merupakan salah satu tumbuhan komersial yang banyak ditanam di seluruh dunia karena memiliki aktivitas biologis sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, analgesik, dan antiinflamasi. Salah satu spesies dari genus *Citrus* yang merupakan tanaman obat keluarga yang banyak digunakan sebagai obat-obatan adalah *Citrus aurantifolia* atau dikenal dengan sebutan Jeruk nipis (Razak dkk., 2013). Tumbuhan ini banyak dikonsumsi dikarenakan spesies tersebut mengandung antioksidan yang tinggi. Aktivitas antioksidan tumbuhan tersebut ditunjukkan dengan adanya metabolit sekunder seperti minyak atsiri dan golongan flavonoid (Herlina dkk., 2020).

Tumbuhan tersebut kaya akan manfaat, di antaranya daun *Citrus aurantifolia* yang secara tradisional digunakan untuk mengobati penyakit kulit dan sebagai antiinflamasi. Kulitnya mengandung berbagai metabolit sekunder yang berperan sebagai antioksidan, antiinflamasi, antibakteri, antikarsinogenik, analgesik, dan antijamur (Loizzo dkk., 2012). Buah *Citrus aurantifolia* mengandung sejumlah besar asam askorbat, asam fenolat, flavonoid, dan minyak atsiri yang dapat digunakan sebagai antioksidan (Wu dkk., 2007), mengatur aktivitas enzim, menghambat proliferasi sel, antibiotik, antialergi, antidiare, antibakteri, antiviral, antimikroba,

antimaag, antijamur, analgesik, antiinflamasi, dan antivirus (Tallei dkk., 2020).

Menurut Herlina dkk. (2020) bagian daun dan kulit buah *Citrus aurantifolia* mengandung metabolit sekunder dengan komponen utama minyak atsiri dan golongan flavonoid. Selain itu terdapat pula limonen yang merupakan komponen utama minyak atsiri yaitu sebanyak 26,04% (Wibaldus dkk., 2016), golongan flavonoid utama seperti hesperidin, rutin, nobelitin, naringin, naringenin, dan tangeritin yang merupakan metabolit sekunder yang terdapat di dalam *Citrus aurantifolia* dengan aktivitas antioksidan yang tinggi. Beberapa struktur metabolit sekunder tersebut dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur hesperidin (A), neohesperidin (B), rutin (C), dan narigin (D) (Dewick, 2009)

Beberapa aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH pada *Citrus aurantifolia* telah dilaporkan yaitu pada ekstrak etanol daun memiliki nilai IC_{50} sebesar 76,90 $\mu\text{g/mL}$ (Reddy, 2012), ekstrak etanol kulit yaitu 54,46 $\mu\text{g/mL}$ (Khasanah dkk., 2014), pada air perasan jeruk nipis sebesar 55,99 $\mu\text{g/mL}$ (Solichah, 2018), dan ekstrak metanol buah jeruk nipis utuh (campuran sari buah dan kulitnya)

memiliki nilai IC_{50} sebesar 1.793,06 g/mL (Khadijah dkk., 2021).

2.4 Bioaktivitas Kombinasi Tumbuhan

Penggunaan kombinasi herbal (poliherbal) telah digunakan dalam praktek obat-obatan sejak ribuan tahun yang lalu untuk meningkatkan efek terapeutik. Beberapa tumbuhan memiliki efek sinergis terhadap tumbuhan lain dan beberapa memiliki efek pelengkap bagi tumbuhan lain (Badejo dkk., 2014; Wasito dkk., 2011). Namun secara teori, kombinasi bahan kimia aktif pada beberapa tumbuhan juga dapat berinteraksi lebih toksik jika dibandingkan dengan hanya menggunakan satu jenis tumbuhan atau dikenal sebagai efek antagonis (Halimatussa'diah dkk., 2014). Perubahan bioaktivitas kombinasi tumbuhan tersebut dikarenakan setiap tumbuhan memiliki metabolit sekunder sehingga ketika digabungkan maka metabolit sekunder yang ada pada masing-masing tumbuhan tersebut akan saling berinteraksi baik secara sinergis maupun antagonis (Halimatussa'diah dkk., 2014; Hidayat, 2011).

Interaksi antara metabolit sekunder pada dua tumbuhan yang berbeda akan saling memengaruhi aktivitas antioksidan dari masing-masing tumbuhan tersebut. Hal tersebut telah dibuktikan oleh Septiawan dkk. (2020) yang mengombinasikan ekstrak etanol alga hijau (*Ulva lactuca* L.) dan lidah buaya (*Aloe vera* L.) serta melakukan uji aktivitas antioksidan dari kombinasi ekstrak tersebut. Nilai IC_{50} kombinasi ekstrak yang diperoleh yaitu 16,51 μ g/mL sedangkan nilai IC_{50} ekstrak tunggal lidah buaya sebesar 64,81 μ g/mL dan ekstrak tunggal alga hijau memiliki nilai IC_{50} sebesar 21,34 μ g/mL. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak tumbuhan tersebut berinteraksi dan menghasilkan aktivitas yang lebih baik dibandingkan tanpa kombinasi.

Beberapa penelitian antioksidan dengan mengombinasikan ekstrak tumbuhan

telah dilakukan untuk meningkatkan aktivitas antioksidan seperti daun sirsak dan daun jambu biji (Wicaksono dan Ulfah, 2017), serta penelitian yang dilakukan oleh Marianne dkk. (2018) yang mengombinasikan rimpang temu giring dan daun pugun tanah. Kombinasi ekstrak dari dua jenis atau lebih tumbuhan yang memiliki kandungan antioksidan diharapkan dapat menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (Septiawan dkk., 2020).

Kombinasi ekstrak dapat dilakukan dengan membandingkan aktivitas beberapa varian kombinasi ekstrak. Penelitian yang dilakukan oleh Sambodo (2019) mengombinasikan ekstrak metanol alga merah (*Eucheuma cottoni*) dan kulit buah lemon (*Citrus limon* L.) dengan perbandingan yaitu 1:1, 2:1, dan 1:2. Kombinasi 1:2 memiliki aktivitas antioksidan paling besar dengan IC_{50} yaitu 345,51 $\mu\text{g/mL}$, disusul kombinasi ekstrak 1:1 sebesar 436,60 $\mu\text{g/mL}$, ekstrak tunggal *Citrus limon* L. sebesar 472,33 $\mu\text{g/mL}$, kombinasi ekstrak 2:1 sebesar 500,09 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan yang memiliki aktivitas antioksidan paling rendah adalah ekstrak tunggal *Eucheuma cottoni* sebesar 942,43 $\mu\text{g/mL}$. Penelitian tersebut memberikan data bahwa beberapa variasi kombinasi memberikan efek sinergis yang meningkatkan aktivitas antioksidan kombinasi sampel dan terdapat pula variasi kombinasi yang menghasilkan aktivitas antagonis menengah karena menurunkan aktivitas antioksidan dari salah satu atau kedua ekstrak karena adanya interaksi antara senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam masing-masing ekstrak (Sambodo, 2019).

Pengembangan juga dapat dilakukan pada kombinasi simplisia atau serbuk tumbuhan sebelum diekstraksi, salah satunya pada penelitian Afifah (2015) yang menggabungkan 3 simplisia tumbuhan yaitu jeringau, temu mangga, dan bawang putih dengan 3 varian komposisi yang diekstraksi menggunakan etanol serta diuji aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} aktivitas antioksidan kombinasi simplisia yang diperoleh

yakni 61,75; 42,76; dan 47,94 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} kombinasi simplisia tersebut lebih rendah dibandingkan dengan nilai IC_{50} ketiga tumbuhan tersebut tanpa kombinasi yakni jeringau, temu mangga, dan bawang putih berturut-turut 349,24 $\mu\text{g/mL}$ (Wati, 2019); 99,33 $\mu\text{g/mL}$ (Mutmainnah, 2015), dan 10,61 mg/mL (Prasanto dkk., 2017) yang menandakan bahwa metabolit sekunder dari kombinasi ketiga tumbuhan tersebut memiliki aktivitas yang sinergis sehingga menghasilkan bioaktivitas yang semakin baik (Afifah, 2015).

Pengombinasian dua jenis tumbuhan yang berbeda yang memiliki bioaktivitas serupa diharapkan dapat menghasilkan bioaktivitas yang semakin baik. Kombinasi dari dua jenis antioksidan memungkinkan untuk mendapatkan hasil potensi aktivitas total antioksidan yang lebih tinggi, yang dikenal dengan efek sinergisme (Lingga, 2012). Tumbuhan alga cokelat *Padina sp.* dan jeruk nipis *Citrus aurantifolia* merupakan tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan sehingga dapat dikombinasikan dan diharapkan dapat meningkatkan bioaktivitas dari masing-masing tumbuhan tersebut. Aktivitas kedua tumbuhan tersebut dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Aktivitas antioksidan alga cokelat *Padina sp.*

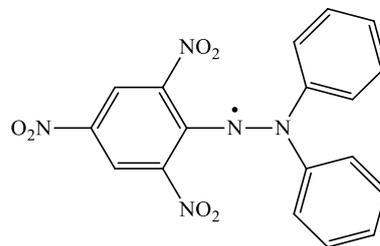
| Ekstrak | Metode | Nilai IC_{50} | Sumber |
|-------------------|--------|-------------------------|------------------|
| <i>n</i> -Heksana | DPPH | 117,36 $\mu\text{g/mL}$ | Akbar dkk., 2020 |
| Etil asetat | DPPH | 115,71 $\mu\text{g/mL}$ | Akbar dkk., 2020 |
| Metanol | DPPH | 116,83 $\mu\text{g/mL}$ | Akbar dkk., 2020 |

Tabel 2. Aktivitas antioksidan jeruk nipis *Citrus aurantifolia*

| Bagian | Ekstrak | Metode | Nilai IC_{50} | Sumber |
|-----------|---------|--------|------------------------|---------------------|
| Kulit | Etanol | DPPH | 54,46 $\mu\text{g/mL}$ | Khasanah dkk., 2014 |
| Sari buah | | DPPH | 55,99 $\mu\text{g/mL}$ | Solichah, 2018 |
| Buah utuh | Metanol | DPPH | 1793,06 g/mL | Khadijah dkk., 2021 |

2.5 Uji Aktivitas Antioksidan Metode 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

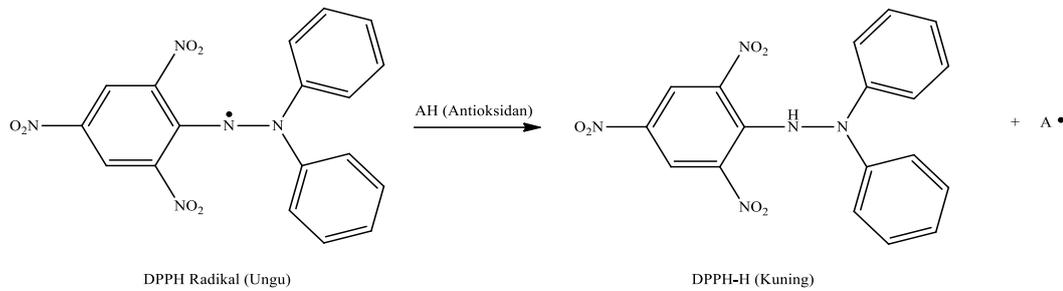
Aktivitas antioksidan suatu senyawa dapat diuji menggunakan beberapa metode, salah satunya dengan menggunakan metode radikal bebas DPPH (Rahim, 2012). Metode DPPH digunakan karena membutuhkan sampel yang lebih sedikit, sederhana, pengerjaan yang mudah, praktis, dan akurat jika dibandingkan dengan metode FRAP dan FIC (Pramesti, 2013; Maesaroh dkk., 2017; Putri dkk., 2020). Struktur DPPH dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Struktur 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) (Fajarwati, 2013)

Prinsip dari metode DPPH adalah mengamati perubahan warna DPPH dalam larutan yang berubah dari warna ungu tua menjadi kuning muda. Perubahan warna tersebut disebabkan karena adanya aktivitas sampel yang mengandung antioksidan yang mampu menangkap dan meredam aktivitas radikal bebas pada DPPH apabila dilarutkan dalam alkohol (Suryowati dkk., 2015). Selain dapat dilihat secara kualitatif, perubahan warna dari ungu menjadi kuning juga bisa diamati menggunakan spektrofotometer UV-Vis melalui nilai absorbansinya. Perubahan warna tersebut akan menimbulkan penurunan nilai serapan sinar dari spektrometometer UV-Vis (Ishak, 2018). Absorbansi berkurang ketika radikal bebas DPPH dihambat oleh antioksidan pada sampel melalui donor hidrogen untuk membentuk DPPH stabil. Reaksi tersebut menyebabkan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning yang menandakan adanya aktivitas antioksidan dalam sampel yang diuji terhadap DPPH

(Rahim, 2012). Namun pengerjaan menggunakan DPPH harus cepat dan hati-hati karena molekul DPPH mudah terdegradasi oleh cahaya dan oksigen. (Fajarwati, 2013). Reaksi yang terjadi antara DPPH dengan antioksidan ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Reaksi antara radikal bebas 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH) dengan senyawa antioksidan (Yuhernita dan Juniarti, 2011)

Tinggi rendahnya aktivitas antioksidan pada sampel dilihat dari nilai *Efficient Concentration* (EC_{50}) atau *Inhibition Contentration* (IC_{50}) yaitu nilai dimana 50% DPPH kehilangan sifat radikal bebasnya. Semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin tinggi aktivitas antioksidan pada sampel. Berdasarkan nilai IC_{50} , tingkat kekuatan antioksidan suatu senyawa dapat ditunjukkan pada Tabel 3 (Fajarwati, 2013):

Tabel 3. Tingkat kekuatan antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} (Putri dan Hidajati, 2015)

| Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) | Tingkat Kekuatan |
|--------------------------------------|------------------|
| <50 | Sangat Kuat |
| 50-100 | Kuat |
| 100-250 | Sedang |
| >250 | Lemah |

Menurut Ernawati (2013), hal-hal yang perlu diperhatikan dalam pengukuran aktivitas antioksidan suatu senyawa salah satunya yaitu panjang

gelombang maksimum DPPH. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk menentukan panjang gelombang dari DPPH yang akan digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel. Hal ini dikarenakan setiap DPPH yang digunakan untuk penentuan aktivitas antioksidan mempunyai panjang gelombang maksimum yang berbeda-beda. Jika pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan pada panjang gelombang maksimum yang tidak sesuai dengan panjang gelombang maksimum DPPH yang digunakan, maka hal tersebut akan memengaruhi hasil pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel.