

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Radikal bebas adalah komponen kimia reaktif yang mengandung elektron tidak berpasangan yang apabila produksinya melebihi aktivitas pertahanan antioksidan endogen dapat menyebabkan stress oksidatif. Stress oksidatif menyebabkan kerusakan pada berbagai komponen seluler yang berujung pada kerusakan jaringan menimbulkan berbagai penyakit kronis, seperti diabetes, aterosklerosis, penyakit arteri koroner, penyakit kardiovaskular, katarak, dan lainnya (Lourenço *et al.*, 2019). Salah satu cara mencegah terjadinya proses stress oksidatif adalah dengan penggunaan antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghentikan proses oksidasi dengan menghambat reaksi radikal bebas (Flieger *et al.*, 2021). Alga cokelat *Padina australis* merupakan salah satu yang berpotensi kuat dijadikan sebagai sumber antioksidan (Chellappan *et al.*, 2020).

Padina australis merupakan salah satu spesies makroalga golongan *Phaeophyta*. Spesies ini memiliki ciri berwarna coklat kekuningan dengan thalli berbentuk kipas membentuk ruas-ruas lembaran tipis (lobus) dengan garis-garis berbulu radial dan pengapuran pada permukaan daunnya (Handayani *et al.*, 2020). *P. australis* mengandung berbagai senyawa potensial diantaranya polisakarida, karotenoid, terpenoid dan asam-asam lemak yang dianalisis secara LC-MS (Thiyagarasaiyar *et al.*, 2021). Selain itu, juga dilaporkan mengandung fukoxanthin, fukosterol, dan floroglusinol yang diidentifikasi menggunakan GC-MS (Klimjit *et al.*, 2021).

Penelitian yang dilakukan oleh Junopia *et al* (2020) melaporkan bahwa *P. australis* mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, dan steroid yang memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 102,590 µg/mL pada ekstrak metanolnya. Thiyagarasaiyar *et al* (2021) juga melaporkan ekstrak etanol dari *P. australis* memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi karena kandungan flavonoid dan fenoliknya yang tinggi. Selain itu, kandungan fukoxhantin pada *Sargassum duplicatum* menunjukkan aktivitas antioksidan yang kuat sehingga juga berpotensi pada *P. australis* (Savira *et al.*, 2021).

Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut diketahui bahwa *P. australis* mengandung sejumlah senyawa dengan potensial aktivitas antioksidan yang tinggi. Senyawa-senyawa tersebut memiliki rentang kepolaran yang berbeda yang akan



dengan berbagai tingkat kepolaran sehingga dapat memberi yang berbeda (Savira *et al.*, 2021; Sari *et al.*, 2020).

Salah satu cara pengujian aktivitas antioksidan adalah dengan uji terhadap radikal asam 2,2'-azinobis-3-etilbenziazolin-6- ini mengukur kapasitas antioksidan untuk menetralkan kation kromofor biru-hijau dengan serapan maksimum pada 734 nm, menurun dengan adanya antioksidan (Munteanu & Apetrei,

2021). Metode ABTS memiliki mekanisme kerja berbasis transfer elektron maupun donor hidrogen sehingga dapat mengukur kemampuan senyawa antioksidan melalui mekanisme tersebut dalam menstabilkan radikal bebas (Theafelicia & Wulan, 2023).

Berdasarkan uraian diatas pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas ekstrak dan fraksi alga cokelat terhadap radikal ABTS untuk mengetahui aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak atau hasil fraksinasi pada sampel *P. australis*.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimana aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi alga cokelat *Padina australis* Hauck terhadap radikal ABTS?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi alga cokelat *Padina australis* Hauck terhadap radikal ABTS.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Penyiapan Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat-alat gelas (Pyrex®), *chamber*, *microplate reader* (BioTek®), labu tentukur, lampu UV 254 nm, lampu UV 366 nm, oven, *rotary evaporator* (Heidolph®), kolom fraksinasi, timbangan analitik (Sartorius®), *water bath*, *96 well plate*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alga cokelat *Padina australis*, *aquadest*, asam askorbat, etanol, etil asetat, kalium persulfat, metanol, n-heksan, radikal *2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)* (ABTS), silika gel 60.

2.2 Prosedur Penelitian

2.2.1 Penyiapan sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga cokelat *Padina australis* yang diperoleh dari Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. Sampel yang diperoleh dicuci bersih dengan air mengalir, lalu dikeringkan menggunakan oven selama 1 x 24 jam pada suhu 150°C, kemudian dihaluskan hingga diperoleh serbuk simplisia.

2.2.2 Ekstraksi sampel

Sampel *P. australis* diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol. Metode maserasi dilakukan dengan cara ditimbang 300 g simplisia dan direndam dengan metanol sebanyak 3000 mL selama 3 x 24 jam dengan pengadukan beberapa kali. Hasil maserasi kemudian disaring dan filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan kecepatan 150 rpm hingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dihitung %rendemen ekstrak kental *P. australis*.

2.2.3 Fraksinasi sampel

Ekstrak *P. australis* difraksinasi dengan metode kromatografi cair vakum (KCV). Ekstrak dikemas dengan cara 6 g ekstrak ditambahkan dengan 6 g silika gel sebagai penyerap, diaduk rata hingga terbentuk serbuk. Kolom fraksinasi diisi dengan silika gel sebanyak 20 g dan dielusi dengan n-Heksan hingga silika gel terdistribusi merata dalam kolom. Ekstrak yang telah dikemas dimasukkan ke kolom dan disebarkan secara merata di atas silika gel. Selanjutnya dielusi dengan n fase gerak n-heksan: etil asetat 100:0; 90:10, 80:20, 50:50, 00% masing-masing sebanyak 50 mL. Pemisahan fraksi yang menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak (3:2) dan diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. memiliki pola Rf yang sama digabung dan fraksi tersebut isis selanjutnya.



2.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan

2.2.4.1 Pembuatan larutan stok ekstrak dan fraksi

Larutan stok ekstrak dan fraksi *P. australis* konsentrasi 1000 µg/mL dibuat dengan cara ditimbang seksama 10 mg ekstrak kental dan fraksi, masing-masing dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL dalam labu tentukur.

2.2.4.2 Pembuatan larutan stok asam askorbat

Larutan stok asam askorbat konsentrasi 1000 µg/mL dibuat dengan cara ditimbang seksama 10 mg asam askorbat dan dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL dalam labu tentukur. Larutan tersebut kemudian diencerkan hingga 100 µg/mL dengan cara dicuplik 100 µL larutan stok 1000 µg/mL dan dicukupkan volumenya dengan metanol hingga 1 mL.

2.2.4.3 Pembuatan larutan kation radikal ABTS

Larutan ABTS 7 mM dibuat dengan cara ditimbang radikal ABTS sebanyak 19 mg dan dilarutkan dengan 5 mL *aquadest*. Kemudian larutan kalium persulfat 3,3 mM dibuat dengan cara ditimbang kalium persulfat sebanyak 3,3 mg dan dilarutkan dengan 5 mL *aquadest*. Kedua larutan tersebut dicampur dan diinkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap. Larutan kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol hingga 25 mL dalam labu tentukur (Sukweenadhi *et al.*, 2020).

2.2.5 Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas ABTS dengan Asam Askorbat dan Larutan Uji

Larutan uji asam askorbat, ekstrak dan fraksi serta blangko dibuat dengan cara dicuplik larutan stok sesuai yang tertera pada **Tabel 1**, **Tabel 2**, **Tabel 3**, dan **Tabel 4**. Kemudian masing-masing ditambahkan metanol sesuai yang tertera ditabel yang sama. Larutan uji kemudian ditambahkan masing-masing larutan radikal sebanyak 30 µL, lalu didiamkan pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah itu diukur absorbansinya menggunakan instrumen *microplate reader* pada panjang gelombang 734 nm. Masing-masing larutan uji dibuat sebanyak 3 replikasi pada mikroplate *96-Well Plate* (Acharya *et al.*, 2017).

Tabel 1. Perbandingan volume asam askorbat, pelarut dan radikal uji antioksidan



Volume asam askorbat (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
-	170	30
4	166	30
8	162	30
12	158	30
16	154	30
20	150	30

Tabel 2. Perbandingan volume larutan uji ekstrak, fraksi B dan fraksi C, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi (µg/mL)	Volume sampel uji (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
Blangko (B)	-	170	30
75	15	155	30
150	30	140	30
225	45	125	30
300	60	110	30
375	75	95	30

Tabel 3. Perbandingan volume larutan uji fraksi A dan fraksi D, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi (µg/mL)	Volume sampel uji (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
Blangko (B)	-	170	30
50	10	160	30
100	20	150	30
150	30	140	30
200	40	130	30
250	50	120	30

Tabel 4. Perbandingan volume larutan uji fraksi E, pelarut dan radikal uji antioksidan

Konsentrasi (µg/mL)	Volume sampel uji (µL)	Volume metanol (µL)	Volume radikal (µL)
Blangko (B)	-	175	30
150	30	95	30
300	60	65	30
450	90	35	30
600	120	5	30
750	150	0	30

2.3 Analisis Data

2.3.1 Perhitungan % inhibisi

Persen inhibisi merupakan data dari hasil pengujian aktivitas antioksidan yang diperlukan untuk menentukan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ menunjukkan aktivitas antioksidan yaitu nilai yang menyebabkan hilangnya aktivitas ABTS sebesar 50%. Persen inhibisi dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Anwar *et al.*,



$$\% \text{Inhibisi} = \frac{(\text{AbsBlanko} - \text{AbsSampel})}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

2.3.2 Perhitungan nilai IC₅₀

Perhitungan nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan persamaan regresi linear konsentrasi sampel dan persen inhibisi. Konsentrasi sampel (x (µg/mL)) dan %inhibisi (y) diplot hingga diperoleh persamaan regresi linier $y = bx + a$. Nilai IC₅₀ dari masing-masing sampel uji diperoleh dengan cara mengubah nilai $y=50$ pada persamaan tersebut. Nilai IC₅₀ ditentukan oleh nilai x dari persamaan tersebut. Perhitungan IC₅₀ dapat dituliskan dengan cara mengubah nilai $y = 50$; $y=bx+a$; $5=bx+a$.

$$x = \frac{50-a}{b}$$

$$IC_{50} = x$$

Hasil perhitungan IC₅₀ menunjukkan aktivitas antioksidan (Anwar *et al.*, 2022). Kategori aktivitas antioksidan ekstrak, fraksi dan asam askorbat berdasarkan nilai IC₅₀ ditentukan sesuai dengan **Tabel 5**.

Tabel 5. Kategori aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC₅₀ (Molyneus, 2004)

Nilai IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
< 50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat lemah

