

BAB 2

Tinjauan Pustaka

2.1 Tinjauan tentang Tanaman *Wolfberry* (*Lycium ruthenicum Murray*)

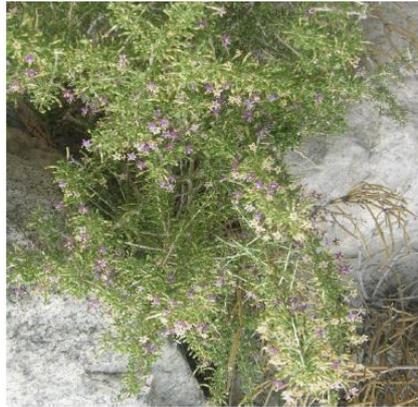
a. Morfologi

Lycium ruthenicum Murray merupakan tumbuhan asli Asia tengah dan Turan. Di Cina tumbuhan ini disebut dengan nama 'Gouqi', secara umum dikenal sebagai 'Wolfberry'. *Wolfberry* dapat tumbuh di tanah berpasir, atau gurun dengan ketinggian 400-3900 meter diatas permukaan laut. *Wolfberry* merupakan tumbuhan semak yang tinggi nya berkisar antara 20-100 cm. Memiliki banyak cabang berwarna abu-abu atau keputihan. Apikal berduri dengan panjang 3-15 mm. Jenis daun linier bilah daun berwarna keabu-abuan dengan panjang daun 0,5-3 cm dan lebar 2-7 mm. *Wolfberry* memiliki bunga berjenis hermafrodit atau berkelamin jantan dan betina. *Wolfberry* memiliki buah berbentuk bulat dengan warna ungu atau hitam berdiameter 6-9 cm dan memiliki biji berwarna coklat dengan ukuran 1,5-2 mm (Priyanka *et al.*, 2011).

b. Klasifikasi

Lycium ruthenicum Murray merupakan tumbuhan beri yang merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili *Solanaceae*. Berikut adalah klasifikasi taksonomi dari *Lycium ruthenicum Murray*.

Kerajaan	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Bangsa	: Solanales
Suku	: Solanaceae
Marga	: <i>Lycium</i>
Jenis	: <i>Lycium Ruthenicum murray</i>



(a)



(b)

Gambar 2. 1(a) Tahap berbunga (b) buah yang sudah matang

c. Kandungan Kimia buah Wolfberry

Dalam *Lycium ruthenicum* Murr., Mengandung polisakarida antara 10%-17%, dan kandungan flavon sekitar 2,71% oleh karena itu dapat mengurangi lipid darah dan antioksidan. Kandungan proteinnya sekitar 11%. Isi dari lemak sekitar 5% -6%. *Lycium ruthenicum* Murr. Mengandung banyak asam lemak tak jenuh dan mineral kaya unsur makro seperti natrium, magnesium, zat besi dan mikro seperti mangan, seng dan kromium karena itu memiliki khasiat anti kanker (Priyanka *et al.*, 2011).

d. Skrining Fitokimia

Senyawa yang ditemukan dalam *wolfberry* sangat beragam diantaranya adalah karoten, polisakarida, minyak atsiri, vitamin c, asam lemak, dan senyawa fenolik seperti antosianin, asam fenolik, stilbena dan flavonol. Berdasarkan penelitian yang dilakukan senyawa yang sudah diidentifikasi sebagai berikut (Wang *et al.*, 2018):

1. Flavonoid

Flavonoid total (TF) yang terkandung dalam *wolfberry* berkisar 36,1-54,7 mg. 46 flavonoid, termasuk 37 antosianin diisolasi dan diidentifikasi dalam buah *wolfberry*. *Quercetin-rhamo-dihexoside* ($934,3 \pm 87,7 \mu\text{g/g}$ FW) adalah flavonoid yang paling banyak ditemukan dalam *wolfberry* (Zhang *et al.*, 2016).

2. Antosianin

Antosianin adalah pigmen alami yang ditemukan pada tanaman. *Wolfberry* yang berwarna hitam mengandung banyak antosianin dan menjadi bahan aktif

utama dalam buah *wolfberry* dengan struktur 5-0-glukosida. Kadar antosianin yang terkandung pada buah *wolfberry* dipengaruhi oleh kultivar, budidaya, pemrosesan. Selain itu konsentrasi pelarut, tekanan, dan suhu juga dapat mempengaruhi hasil ekstraksi antosianin. Para peneliti telah mengisolasi dan mengidentifikasi 37 antosianin dari buah *wolfberry*, termasuk turunan dari *peonidin*, *petundin*, *pelargonidin*, *cyanidin*, *malvidin*, dan *delphinidin* (Zheng *et al.*, 2011). Pelarut yang bersifat asam dengan pH 1-3 dapat mempertahankan sstruktur antosianin, antosianin terasilasi lebih stabil daripada antosianin non-terasilasi berdasarkan fotostabilitas dan tes termostabilitas (Hu *et al.*, 2014).

3. Polisakarida

Total kandungan polisakarida dalam buah *wolfberry* adalah $56,1 \pm 3,1$ mg/g. Polisakarida yang diisolasi dari buah *wolfberry* mengandung 93,2% karbohidrat dan mengandung 4,4% protein. 68,7% diantaranya adalah gula netral dan 24,5% adalah gula asam. Komponen polisakarida merupakan glukukan dan *rhamnogalacturonan I*, sesuai dengan komposisi monosakarida dan rasio Rha/GaIUA. Komposisi monosakarida adalah sebagai berikut arabinosa (40,7%), asam galakturonat (26,4%), galaktosa (18,9%), (18,9%), *xylose* (5,1%), *rhamnose* (4,9%), glukosa (2,7%), dan *mannose* (1,3%) (Zhang *et al.*, 2016).

4. Asam Fenolik

Fenolik merupakan metabolik sekunder yang melimpah pada tanaman. Senyawa fenolik yang paling melimpah pada *wolfberry* adalah kukoamine A Nzeuwa *et al.*, (2017). Total fenolik adalah $26,9 \pm 4,5$ mg, dan asam klorogenat $112,5 \pm 8,4$ μ g/g merupakan asam fenolik yang paling banyak terkandung dalam *wolfberry*. Terdapat 14 asam fenolik yang diisolasi dan diidentifikasi dalam buah *wolfberry*, jumlah keseluruhan fenolik adalah $36,1 \pm 2,8$ mg/g (Zhang *et al.*, 2016).

5. Karotenoid

Total kandungan karotenoid dalam *wolfberry* adalah 0,084% atau $0,40 \pm 0,05$ mg GAE / g FW. *Zeaxanthin* (0,031% atau $17,01 \pm 0,2$ μ g / g FW) adalah karotenoid dominan di Buah *wolfberry* (Peng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2016).

6. Alkaloid

24 alkaloid, dan sekelompok amida asam hidroksisinamatik, diisolasi dan diidentifikasi buah-buahan dari *wolfberry*. Dilaporkan bahwa amida asam hidroksisinamatik terlibat dalam pertahanan tanaman terhadap patogen (Muroi *et al.* 2009).

7. Minyak Esensial

Sebanyak delapan belas minyak esensial suling air diisolasi dan diidentifikasi dalam buah *wolfberry*. Komposisi minyak atsiri adalah sebagai berikut: *heptacosane* (14,3%), *ethyl linoleat* (10,0%), *hexacosane* (7,0%), *nonacosane* (6,2%), *etil hexadecanoate* (5,8%), *methyl linoleat* (5,6%), *octacosane* (5,2%), *farnesylacetone* (4,6%), *methyl hexadecanoate* (4,5%), *tetracosane* (3,9%), *phytol* (3,0%), *hexahydrofarnesylacetone* (2,7%), *tricosane* (2,5%), *docosane* (1,5%), 13(E) –*geranylacetone* (1,1%), *heneicosane* (0,9%), (E, E) -2,4-*decadienal* (0,8%), dan *hexadecane* (0,8%) (Altintas *et al.*, 2006).

8. Asam Lemak

Minyak mentah buah dan biji *wolfberry* termasuk jenuh, tak jenuh tunggal dan asam lemak tak jenuh ganda. Asam lemak yang diidentifikasi ditunjukkan pada Linoleat, oleat, dan asam palmitat adalah komponen utama dari kedua minyak. Minyak-minyak tersebut merupakan asam jenuh utama, tak jenuh tunggal, dan asam lemak tak jenuh ganda. Selain itu, asam pentadekanoat hanya ada dalam minyak buah *wolfberry* (Chi *et al.*, 2016).

e. Efek Farmakologi

Wolfberry merupakan buah yang digunakan sebagai makanan dan juga obat tradisional, pada pengobatan tradisional yang didasarkan pada pengalaman tanpa pemahaman tentang mekanisme biologis buah ini digunakan untuk obat dan makanan. Buah *wolfberry* juga dapat digunakan untuk pengobatan penyakit jantung, menstruasi abnormal, menopause, batu uretra dan ureter, tinea dan furunkel, dan gingiva perdarahan (Dierma & Mao, 2012). Buah *wolfberry* mengandung antosianin, yang merupakan jenis flavonoid. Dua pertiga dari setiap hari asupan polifenol berasal dari flavonoid. Polifenol dapat memiliki efek anti-trombotik dan dapat mengurangi penyakit kardiovaskular dengan mencegah stres oksidatif (Zheng *et al.*, 2011). Struktur 14 antosianin juga mempengaruhi aktivitas antioksidan mereka. Hidroksilasi dan antosianin meningkatkan aktivitas antioksidan

(Hu et al., 2014). Ekstrak buah *wolfberry* dengan n-butanol atau 70% etanol menunjukkan kemampuan yang kuat untuk mengais radikal bebas, lebih kuat dari ekstrak buah *L. Barbarum* (Kosar et al., 2003). Antosianin yang diekstrak dari *L.ruthenicum* dapat menyembuhkan kardiomiopati diabetes dengan mengurangi stres oksidatif, fibrosis miokard, disfungsi jantung, dan apoptosis sel (Xue et al., 2014).

2.2 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang mampu melindungi sel dari bahaya radikal bebas oksigen reaktif (Winarsi, 2014). Antioksidan bekerja dengan mendonorkan elektronnya pada senyawa yang memiliki sifat oksidan yakni dengan mengikat oksigen dan melepaskan hidrogen. Proses oksidasi berperan penting untuk metabolisme tubuh. Apabila molekul yang dihasilkan berlebihan maka akan merusak kesehatan (Musarofah, 2015).

Menurut Deddy Muchtadi Produksi antioksidan di dalam tubuh manusia terjadi secara alami untuk mengimbangi produksi radikal bebas. Antioksidan lalu berperan menjadi sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas, namun peningkatan produksi radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stress, radiasi UV, polusi udara dan lingkungan mengakibatkan sistem pertahanan tersebut kurang memadai, sehingga diperlukan tambahan antioksidan dari luar.

Antioksidan di luar tubuh dapat diperoleh dalam bentuk sintesis dan alami. Antioksidan sintesis seperti *buthylatedhydroxytoluene* (BHT), *buthylated hidroksianisol* (BHA) dan *ters-butylhydroquinone* (TBHQ) secara efektif dapat menghambat oksidasi. Namun penggunaan antioksidan sintetik dibatasi oleh aturan pemerintah karena, jika penggunaannya melebihi batas justru dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan bersifat karsiogenik, sehingga dibutuhkan antioksidan alami yang aman. Salah satu sumber potensial antioksidan alami adalah tanaman karena mengandung senyawa flavonoid, klorofil dan tanin (Lie Jin et al., 2012).

Terdapat banyak bahan pangan yang dapat dijadikan sumber antioksidan yang alami misalnya yaitu rempah-rempah, teh, coklat, dedaunan, biji-biji sereal, sayuran, sumber bahan pangan yang kaya akan enzim dan protein. Tumbuhan pada umumnya merupakan sumber senyawa antioksidan alami yang

berupa senyawa fenolik yang terletak pada hampir seluruh bagian tumbuhan yaitu pada kayu, biji, daun, buah, akar, bunga ataupun serbuk sari (Sarastani, *et al.*, 2002).

Menurut Munisa *et al.*, (2012) antioksidan mengandung senyawa fenolik atau polifenolik yang merupakan golongan flavonoid. Pada saat ini sangat banyak penelitian yang tentang senyawa flavonoid sebagai antioksidan, hal ini dikarenakan aktivitas antioksidan yang terdapat pada senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk merubah atau mereduksi resiko yang dapat ditimbulkan oleh radikal bebas dan juga dapat dimanfaatkan sebagai anti-radikal bebas.

Berdasarkan mekanisme reaksinya antioksidan dibagi menjadi beberapa jenis, yaitu sebagai berikut:

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer adalah suatu senyawa yang bisa menghentikan reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang melepaskan hidrogen. Antioksidan primer dapat berasal dari bahan alam maupun sintetis. Contohnya seperti *Buthylated hidroxytoluene* (BHT).

Antioksidan primer dapat menerima radikal bebas dan lebih lanjut menunda langkah inisiasi atau mengganggu langkah propagasi auto-oksidasi (Reische *et al.*, 1998). Antioksidan primer (AH) dapat bereaksi dengan radikal lipid dan peroksil mengubahnya menjadi radikal yang lebih stabil atau produk non-radikal ($R \cdot + Ahg RH + A \cdot$) ($RO \cdot + Ahg ROH + A \cdot$) ($ROO \cdot + AH g ROOH + A \cdot$) Radikal antioksidan ($A \cdot$) yang dihasilkan oleh proses ini jauh lebih reaktif daripada radikal lipid atau peroksil, dan karenanya tidak mendorong oksidasi seperti halnya radikal lipid atau radikal peroksil. Radikal antioksidan ini, pada kenyataannya, juga dapat menghentikan reaksi oksidasi lipid dengan bereaksi dengan radikal peroksil, radikal alkoksil dan antioksidan lainnya ($RO \cdot + A \cdot g ROA$) ($ROO \cdot + A \cdot g ROOA$) ($A \cdot + A \cdot g AA$) (McClements and Decker, 2000).

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogeneus atau non enzimatis. Antioksidan sekunder dapat menghambat oksidasi lipid melalui berbagai mekanisme, termasuk chelating ion logam transisi, pemulungan oksigen,

pengisian hidrogen menjadi antioksidan primer, menyerap radiasi UV dan menonaktifkan spesies reaktif (Reische et al., 1998; Gordon, 1990). Namun perlu dicatat bahwa jenis zat tertentu memiliki lebih dari satu mekanisme aktivitas antioksidan (McClements dan Decker, 2000). Diketahui bahwa senyawa fenolik alami yang berbeda berfungsi sebagai antioksidan primer dan sekunder dengan mekanisme yang berbeda. Antioksidan Multi Fungsi dapat menggabungkan fungsi antioksidan primer dan sekunder dalam satu senyawa, baru belakangan ini tersedia. *Hydroxylamines*, yang mampu membersihkan radikal C, bertindak sebagai antioksidan primer dan sekunder.

3. Antioksidan Tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi sistem enzim DNA-Repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim ini berperan dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya *Single* dan *Double strand* baik gugus non-basa maupun basa (Mishra R. *Et., al.* 2011).

4. Antioksidan Sintetik

Antioksidan sintetik adalah senyawa fenolik seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tersier butylhydroquinone* (TBHQ) dan *propyl gallate* (PG) yang banyak digunakan dalam industri. Sebagian besar digunakan dalam industri makanan karena efektivitasnya dan lebih murah. Mereka beracun dan memiliki potensi karsinogenik yang mengarah pada kebutuhan akan alternatif alami (Thompson *et al.*, 1988).

5. Antioksidan Alami

Antioksidan alami ditemukan di hampir semua tanaman, mikroorganisme, jamur, dan bahkan dalam jaringan hewan (Pokorny, 2001). Mayoritas antioksidan alami adalah senyawa fenolik, dan kelompok antioksidan alami yang paling penting adalah tokoferol, flavonoid, dan asam fenolik. Efek menguntungkan dari mengonsumsi makanan nabati berhubungan dengan menurunkan risiko sebagian besar penyakit kardiovaskular dan kanker, di antara penyakit degeneratif penuaan lainnya (Cuppert *et al.*, 1997).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas dan oksidan lainnya semakin penting dalam bidang biologi karena peran sentralnya dalam berbagai kondisi fisiologis serta implikasinya dalam beragam penyakit. Radikal bebas, baik spesies oksigen reaktif (ROS) dan nitrogen reaktif spesies (RNS), berasal dari sumber endogen (mitokondria, peroksisom, retikulum endoplasma, sel fagositik, dll.) dan sumber eksogen (polusi, alkohol, asap tembakau, logam berat, logam transisi, pelarut industri, pestisida, obat-obatan tertentu seperti halotan, parasetamol, dan radiasi). Radikal bebas dapat berdampak buruk pada berbagai kelas penting molekul biologis seperti asam nukleat, lipid, dan protein. Sehingga mengubah status redoks normal yang mengarah pada peningkatan stres oksidatif. Stres radikal bebas yang diinduksi stres oksidatif telah dilaporkan terlibat dalam beberapa kondisi penyakit seperti diabetes mellitus, gangguan neurodegeneratif (penyakit *Parkinson-PD*, penyakit *Alzheimer-AD* dan *Multiple sclerosis-MS*), penyakit kardiovaskular (aterosklerosis dan hipertensi), penyakit pernapasan (asma), perkembangan katarak, *rheumatoid arthritis* dan berbagai kanker (kolorektal, prostat, payudara, paru-paru, kanker kandung kemih). Tinjauan ini berkaitan dengan kimia, pembentukan dan sumber, dan target molekul radikal bebas dan memberikan gambaran singkat tentang patogenesis berbagai kondisi penyakit yang disebabkan oleh ROS / RNS (Phaniendra A. *et al.*, 2014).

Jumlah radikal bebas yang tidak seimbang dengan jumlah antioksidan yang diproduksi oleh tubuh seperti Superoksida dismutase (SOD), *Glutation peroksidase* (GPx) dan *Catalase* (CAT) disebut stres oksidatif. Keadaan seperti ini memungkinkan kerusakan sel yang dapat menyebabkan beragam penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Radikal bebas dapat berada di dalam tubuh karena adanya hasil samping dari proses oksidasi dan pembakaran sel yang berlangsung pada waktu bernafas, metabolisme sel, olahraga atau aktivitas fisik yang berlebihan atau maksimal, peradangan, dan terpapar polusi dari luar tubuh seperti asap kendaraan, asap rokok, makanan, logam berat industri dan radiasi matahari (Made Oka, 2016).

Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau

reactive oxygen species (ROS). Radikal-radikal bebas ini merupakan hasil pemecahan homolitik dari ikatan kovalen suatu molekul atau pasangan elektron bebas suatu atom. ROS merupakan bagian dari hasil metabolisme sel normal atau sel yang terpapar zat-zat lain yang menyebabkan terjadinya inflamasi atau peradangan. ROS sebagian besar merupakan hasil dari respon fisiologis (ROS endogen) yaitu hasil metabolisme sel normal dan sebagian kecil merupakan hasil paparan dari luar tubuh (ROS eksogen) yaitu oksigen reaktif yang berasal dari polutan lingkungan, radiasi, infeksi bakteri, jamur dan virus.

ROS terdiri dari superoksida ($*O_2$), hidroksil ($*OH$), peroksil ($ROO*$), hidrogen peroksida (H_2O_2), singlet oksigen (1O_2), oksida nitrit ($NO*$), peroksinitrit ($ONOO*$), asam hipoklorit ($HOCl$), dan hasil oksidasi lemak pada makanan. Radikal bebas yang paling banyak terbentuk di dalam tubuh adalah superoksida. Superoksida ini akan diubah menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2). Hidrogen ini dalam tahap propagasi akan diubah menjadi radikal hidroksil ($*OH$). Radikal hidrosil inilah yang menyebabkan terjadinya peroksidasi lemak pada membran sel sehingga sel mengalami kerusakan. Keadaan ini kalau dibiarkan terus akan menyebabkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dengan antioksidan endogen yang dikenal dengan nama stres oksidatif (Made Oka, 2016).

2.4 Pengujian Antioksidan

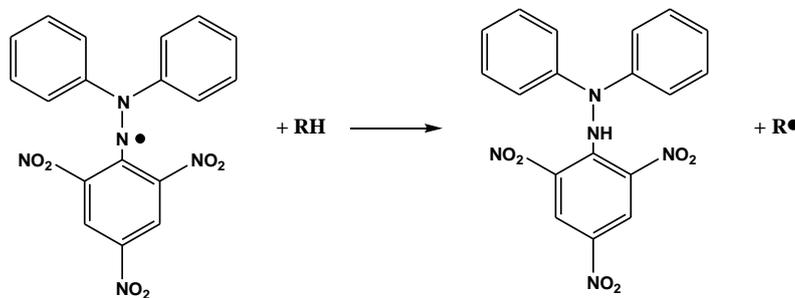
a. DPPH (2,2 dipenyl-1-picrylhidrazyl)

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan secara *in vitro* dengan metode DPPH. DPPH (*2,2 dipenyl-1-picrylhidrazyl*) merupakan suatu senyawa radikal yang bersifat stabil. Metode ini digunakan untuk mengetahui melalui kemampuannya dalam menangkap radikal bebas dimana aktivitas antioksidan diukur berdasarkan transfer electron. Awal mulanya DPPH yang berwarna pekat memberikan serapan pada panjang gelombang 517nm tetapi setelah mengalami reduksi maka DPPH akan berubah menjadi senyawa difenil pikril hidrazin. Warna ungu akan berangsur-angsur memudar menjadi warna kuning dan nilai serapannya akan sebanding dengan jumlah electron yang diterima.

Metode DPPH memiliki keunggulan yaitu metode analisisnya yang bersifat sederhana, cepat, mudah dan sensitif terhadap sampel dengan konsentrasi yang kecil namun pengujian menggunakan DPPH terbatas karena DPPH hanya dapat

dilarutkan dalam pelarut organik sehingga agak sulit untuk menganalisis senyawa yang bersifat hidrofilik (Karadag, 2009). Metode ini tidak spesifik untuk komponen antioksidan tertentu, tetapi untuk semua senyawa antioksidan dalam sampel. DPPH umum digunakan sebagai metode pengujian aktivitas antioksidan pada makanan. Pada metode DPPH akan mengalami perubahan warna menjadi kuning saat radikal DPPH berpasangan dengan atom hidrogen dari antioksidan membentuk DPPH-H. Aktivitas antioksidan yang terjadi pada metode DPPH dapat dihitung dengan rumus:

$$:\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (2.1)$$



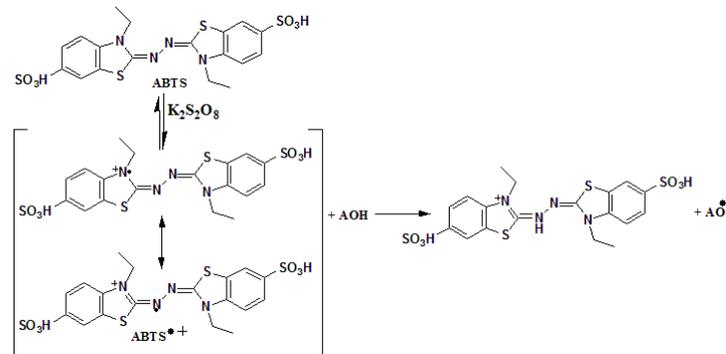
Gambar 2. 2 Mekanisme DPPH

b. ABTS

Metode pengujian ABTS berprinsip pada penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. ABTS mempunyai karakter warna yang khas yaitu biru-hijau, yang jika direduksi antioksidan akan berubah menjadi tidak berwarna (Pisoschi and Negulescu, 2011). ABTS adalah reagen yang dapat tetap stabil selama tiga hari dalam ruang gelap di suhu 25 °C (Konan et al., 2016). Kelebihan dari metode ABTS yaitu ABTS dapat bereaksi cepat dengan antioksidan, dapat digunakan pada rentang pH yang lebar, dapat larut dalam air dan pelarut organik (Prior et al., 2005). Kekurangan dari metode tersebut yaitu harga dari reagen ABTS mahal. Metode ABTS lebih baik daripada metode DPPH karena metode ABTS lebih sensitif daripada DPPH dan juga metode ABTS dapat digunakan pada tingkat pH yang berbeda sedangkan DPPH sensitif terhadap pH asam (Shalaby *et al.*, 2013).

Pengujian didasarkan pada kemampuan dari masing-masing substansi untuk membentuk kation radikal (ABTS • +) yang telah dimodifikasi. ABTS • + dibuat

dengan mereaksikan larutan stok ABTS 7 mM dengan 2,45 mM kalium persulfat dan membiarkan campuran dalam ruang gelap pada suhu kamar selama 12 – 16 jam. Untuk pengukuran, larutan ABTS • + diencerkan dengan air untuk uji hidrofilik dan dengan etanol untuk lipofilik sampai absorbansi 0,700 (+0,020) pada 734 nm (Schlesier *et al.*, 2002). Kation radikal ABTS yang terbentuk menunjukkan penyerapan maksimal pada berbagai panjang gelombang: 415 nm, 645 nm, 734 nm dan 815 nm (Litescuet *et al.*, 2010). Dua puluh sampai seratus μ l ekstrak dicampur dengan 6 ml larutan ABTS . Penurunan absorbansi dicatat pada 1 menit setelah pencampuran. ABTS dihasilkan dengan mereaksikan zat pengoksidasi kuat (kaliumpermanganat atau kalium persulfat) dengan garam ABTS (Shalaby, 2013).



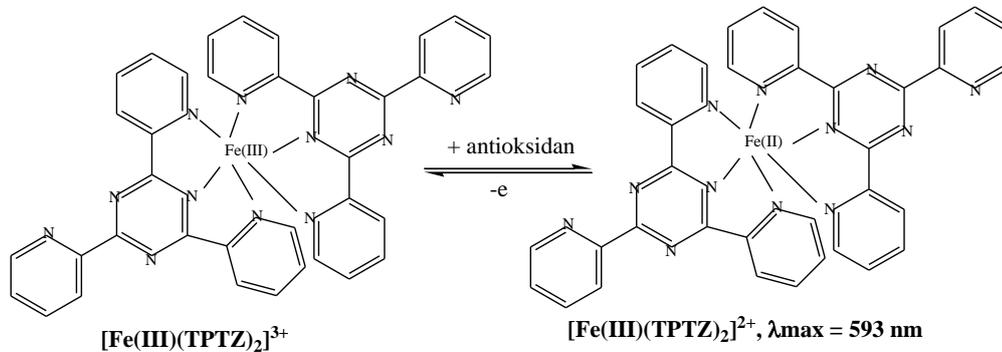
Gambar 2. 3 Mekanisme ABTS

c. FRAP

Menurut Panda (2012) Metode ini berdasarkan pada reaksi reduksi dalam suasana asam terhadap senyawa kompleks Fe^{3+} (Kalium heksasianoferat) yang berwarna kuning menjadi senyawa kompleks Fe^{2+} yang berwarna hijau kebiruan akibat donor elektron dari senyawa antioksidan. Metode uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP ini dapat dimonitor dengan pengukuran serapan senyawa kompleks Fe^{2+} yang terbentuk dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 700 nm.

Metode ini mengukur kemampuan antioksidan untuk mereduksi ferric Besi. Hal ini didasarkan pada reduksi kompleks ferric besi dan 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniacyclopenta-1,4-dienaklorida (TPTZ) ke bentuk ferrous pada ph asam. Cara metode ini dengan 3 ml RA di tambahkan 100 l sampel, kemudian di

absorpsi pada panjang gelombang 3 nm setelah di inkubasi selama 30 menit pada suhu 3 C (Alam et al., 2013). Kelebihan metode ini yaitu sederhana, cepat, murah, dan tidak memerlukan peralatan khusus (Shalaby *et al.*, 2013).



Gambar 2. 4 Mekanisme FRAP

2.5 Tinjauan Optimasi pelarut

Salah satu parameter yang mempengaruhi kualitas ekstrak yaitu pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Menurut Sa'adah *et al.*, (2015) untuk mendapatkan kaungan zat aktif yang tinggi, maka perlu dilakukan optimasi pembuatan ekstrak, salah satunya optimasi jenis pelarut. Jenis pelarut akan menentukan jenis zat yang sesuai dengan polaritasnya.

Secara umum optimasi jenis pelarut dalam ekstraksi dapat dilakukan dengan cara berturut-turut mulai dengan pelarut non-polar, lalu dengan pelarut semi polar, kemudian dengan pelarut polar. Sehingga dengan demikian akan diperoleh ekstrak yang secara berturut-turut mewakili semua jenis senyawa pelarut yaitu non-polar, semi polar, dan polar.

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses di mana satu atau lebih komponen dipisahkan secara selektif dari campuran cair atau padat, umpan (Fase 1), dengan cara pelarut tidak larut cairan (Fase 2). Pemindahan komponen dari umpan ke pelarut dikendalikan oleh perilaku kelarutan masing-masing komponen dalam fase yang sesuai. Dua fase dihasilkan dari langkah ekstraksi: yaitu fase diperkaya (Fase ekstrak) dan fase habis (Fase rafinat) dalam komponen yang akan dipisahkan (Spring 2014).

Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada beberapa target ekstraksi diantaranya :

1. Senyawa bioaktif yang tidak diketahui.
2. Senyawa yang diketahui ada pada suatu organisme.
3. Sekelompok senyawa dalam suatu organisme yang berhubungan secara struktural.

Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut :

1. Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, bunga, dll), pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan.
2. Pemilihan pelarut
3. Pelarut polar: air, etanol, metanol, dan sebagainya.
4. Pelarut semipolar: etil asetat, diklorometan, dan sebagainya.
5. Pelarut nonpolar: n-heksan, petroleum eter, kloroform, dan sebagainya.

Ada banyak macam-macam metode ekstraksi dengan prinsip kerja yang berbeda-beda. Berikut adalah macam-macam metode ekstraksi:

1. Maserasi

Metode ekstraksi maserasi adalah metode yang paling banyak digunakan karena memiliki prinsip kerja yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara menghaluskan bahan-bahan tumbuhan lalu direndam dengan pelarut terpilih, kemudian disimpan dalam jangka waktu tertentu. Penyimpanan biasa menggunakan bejana tertutup pada suhu ruang (Handa *et al.*, 2018). Bejana disimpan terlindung dari cahaya langsung. Campuran pelarut dan simplisia dalam bejana didiamkan selama 3-7 hari dan sesekali bejana di guncangkan untuk menjaga keseimbangan konsentrasi simplisia dalam pelarut (Voight, 1994).

Menurut (T. Balakrishna *et al.*, 2016) Bejana didiamkan selama beberapa hari memiliki beberapa tujuan yaitu:

1. Untuk membantu pelarut menembus sel simplisia.
2. Menyediakan waktu yang cukup untuk mempartisi senyawa aktif ke dalam pelarut.
3. Untuk mentransfer senyawa aktif keluar dari sel dalam jumlah besar.

Cairan penyari atau pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif dan zat aktif akan larut. Maserasi umumnya digunakan jika senyawa yang terdapat pada tumbuhan cukup tinggi dan pelarut yang sesuai dapat melarutkan dengan baik senyawa tersebut telah diketahui.

Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi akan didapatkan filtrat atau zat terlarut dalam pelarut. Kemudian filtrat yang didapatkan dipisahkan dari sampel dengan metode penyaringan menggunakan kertas saring. Penyaringan ini ditujukan untuk mendapatkan filtrat yang baik, artinya tidak mengandung partikel-partikel bahan tumbuhan baik partikel halus maupun kasar.

Setelah didapatkan filtrat yang sudah disaring, selanjutnya filtrat diuapkan, penguapan ini dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu dengan penguapan secara alami dan penguapan menggunakan alat penguap *rotary evaporator*, penguapan dengan metode secara alami lebih umum digunakan karena tidak membutuhkan peralatan dan biaya yang banyak, penguapan dengan metode alami ini memiliki beberapa kelemahan yaitu filtrat akan lebih mudah terkena pengotor karena penguapan dilakukan dengan wadah terbuka dan membutuhkan waktu penguapan yang lama. Sedangkan *rotary evaporator* dapat menguapkan pelarut dengan cepat dan aman dari faktor-faktor pengotor.

Metode maserasi memiliki beberapa kerugian yaitu proses ekstraksi membutuhkan pelarut yang cukup banyak, membutuhkan waktu yang relatif lama. Selain itu ada kemungkinan beberapa senyawa hilang, lalu beberapa senyawa sulit diekstraksi pada suhu kamar. Disisi lain, metode maserasi dapat digunakan untuk menghindari kerusakan senyawa yang bersifat termolabil.

2. Perkolasi

Perkolasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara penetesan cairan pelarut dalam wadah berbentuk kerucut atau silinder yang disebut perkolator. Dalam prosesnya, metode ekstraksi perkolasi terdiri dari beberapa tahapan diantaranya pengembangan bahan, tahap perendaman bahan, dan tahap perkolasi (penetesan, penampungan perkolat) sampai diperoleh ekstrak (Depkes, 2000).

Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel harus di keringkan dan dihaluskan hingga berbentuk bubuk agar kandungan air dalam sampel hilang dan kandungan senyawa yang terdapat pada sampel dapat lebih mudah terlarut dalam cairan pelarut. Sampel yang sudah berupa bubuk direndam menggunakan pelarut dan dibiarkan dalam waktu tertentu. Pendiaman ini dilakukan untuk mempermudah pelarut masuk ke dalam sel. Serbuk simplisia ditempatkan dalam bejana silinder yang bagian bawahnya terdapat sekat berpori, lalu cairan pelarut dialirkan dari atas ke bawah yang nantinya akan melalui serbuk sampel, cairan pelarut akan melarutkan zat aktif yang terdapat dalam sel-sel simplisia yang dialiri cairan pelarut. Gerakan kebawah disebabkan oleh kekuatan gaya beratnya sendiri dan tekanan penyari dari cairan di atasnya, dikurangi dengan daya kapiler yang cenderung untuk menahan gerakan ke bawah (Dirjen POM, 2014).

3. Sokletasi

Metode sokletasi umumnya digunakan sebagai pengekstraksi senyawa yang kelarutannya terbatas dalam suatu pelarut dan pengotor-prngotornya tidak larut dalam pelarut tersebut. Sampel yang digunakan dan yang dipisahkan dengan metode ini berbentuk padatan. Metode sokletasi ini dapat digolongkan sebagai ekstraksi padat-cair berdasarkan mekanisme kerjanya.

Alat sokletasi terdiri dari labu alas bulat, tabung siphon, jalur distilasi, adaptor ekspansi, kondensor, saluran masuk air pendingin, saluran keluar pendingin, sumber panas dan bidal. Dalam metode ini, sampel serbuk ditutup dalam kantung berpori atau "*thimble*" yang terbuat dari kertas saring atau selulosa yang kuat, yang ditempatkan, di dalam ruang bidal dari peralatan soklet. Pelarut ekstraksi diambil dalam labu alas bulat dan dipanaskan dengan menggunakan sumber pemanas seperti mantel pemanas. Suhu pemanasan dibangun di atas pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Karena panas pelarut dalam labu bawah menguap ke kondensor dan kemudian menetes kembali ke sampel bidal. Ketika kandungan cairan mencapai lengan siphon, isi cairan dikosongkan ke labu bawah lagi dan proses adalah akhir dari proses ditunjukkan solusi yang jelas dalam tabung siphon. Metode ini tidak cocok untuk senyawa termo labil karena pemanasan yang lama dapat menyebabkan degradasi senyawa. Metode ini mempertahankan suhu ekstraksi yang relatif tinggi dengan panas dari labu destilasi. Tidak diperlukan

filtrasi ekstrak dan perpindahan keseimbangan transfer dengan sering membawa pelarut segar ke dalam kontak dengan matriks padat.

Menurut Muh. Adiyasaka (2017) Metode ekstraksi sokletasi merupakan metode ekstraksi yang memiliki prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Yang selanjutnya menyebabkan pemecahan dinding sel dan membran sel yang menghasilkan perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel. Sehingga metabolit sekunder yang terkandung dalam sitoplasma dapat terlarut ke dalam pelarut.

Berikut adalah syarat-syarat pelarut yang dapat digunakan dalam proses soxhletasi:

1. Pelarut memiliki titik didih yang rendah
2. Pelarut mudah menguap
3. Sifat pelarut sesuai dengan senyawa yang akan diisolasi
4. Pelarut dapat melarutkan senyawa yang diinginkan
5. Pelarut dapat terpisah setelah pengocokan

4. Refluks

Refluks merupakan metode ekstraksi dengan bantuan pemanasan dan mampu mengekstraksi andrografolid yang merupakan senyawa tahan panas. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses ekstraksi diantaranya jumlah pelarut dan waktu ekstraksi. Jumlah pelarut menjadi faktor kritis dalam ekstraksi karena pada prinsipnya volume pelarut harus mencukupi untuk melarutkan senyawa yang akan diekstraksi. (Laksmiani *et al.*, 2016)

Sampel yang akan diekstraksi ditempatkan pada labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak lalu direndam dengan cairan pelarut, selanjutnya dipanaskan hingga mendidih. Pelarut akan menguap karena proses pemanasan, selanjutnya uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin dan akan menjadi zat aktif kembali. Ekstraksi ini umumnya dilakukan sebanyak tiga kali setiap proses ekstraksi biasanya berlangsung selama empat jam (Tobo, 2001)

5. *Ultrasonic-assisted extraction* (UAE)

Ekstraksi ultrasound adalah metode maserasi yang menggunakan bantuan sinyal dengan frekuensi yang tinggi ± 20 kHz. Mekanisme metode ekstraksi ini adalah dengan menyebabkan kerusakan sel sehingga kelarutan senyawa dalam pelarut meningkatkan hasil ekstraksi. Sampel dimasukkan dalam wadah *ultrasonic*

& *ultrasound* untuk memberikan tekanan mekanik pada sel sehingga menghasilkan rongga pada sampel.

2.7 Tinjauan Tentang *Ultrasonic-assisted extraction* (UAE)

Ultrasonic-assisted extraction (UAE) adalah salah satu metode ekstraksi berbantu ultrasonik. Gelombang ultrasonik adalah gelombang suara yang memiliki frekuensi diatas pendengaran manusia (≥ 20 kHz). Metode ini biasa digunakan untuk mempersingkat waktu ekstraksi dengan perolehan kandungan antioksidan yang relatif lebih tinggi. Ultrasonik memiliki sifat *non-destructive* dan *non-invasive* dimana metode ini dapat diadaptasikan ke berbagai aplikasi (McClements 1995). Proses ekstraksi senyawa organik pada biji-bijian maupun tanaman dapat dipercepat dengan bantuan ultrasonik. Dengan getaran yang dihasilkan ultrasonik dinding sel dari bahan dipecah sehingga kandungan yang berada dalam sampel dapat dengan mudah keluar (Mason, 1990).

Ekstraksi ultrasonik merupakan ekstraksi dengan perambatan energi melalui gelombang ultrasonik dengan menggunakan cairan sebagai media perambatan yang dapat meningkatkan intensitas perpindahan energi, sehingga proses ekstraksi lebih maksimal. Proses dari ekstraksi ultrasonik yaitu gelombang ultrasonik mengenai sampel menyebabkan tegangan mekanik, sehingga sampel menjadi partikel dengan ruang-ruang kecil dan gelombang ini menimbulkan efek kavitasi. Efek kavitasi ini merupakan proses pembentukan gelembung-gelembung mikro yang dikarenakan meningkatnya tekanan pada ekstraksi akibat gelombang ultrasonik. Gelembung kavitasi tersebut akan memecah dinding sel dan pelarut akan berdifusi dalam sel, sehingga senyawa alkaloid yang ada didalam sel akan keluar dan terekstraksi (Torres *et al.*, 2017).

UAE merupakan merupakan metode maserasi yang sudah dimodifikasi dengan bantuan frekuensi ultrasonik. Seiring perkembangan teknologi metode maserasi dirasa sudah tidak efisien dalam segi penggunaan pelarut serta waktu ekstraksi. Sehingga metode UAE merupakan terobosan untuk mempersingkat waktu ekstraksi serta memperoleh ekstrak yang lebih maksimal dengan jumlah pelarut yang lebih sedikit.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh (Utami *et al.*, 2009) yaitu dengan membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun simpur

dengan berbagai metode ekstraksi, mendapatkan hasil berupa perbedaan aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh metode ekstraksi. Metode ekstraksi UAE menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling tinggi diantara metode ekstraksi lain.

2.8 Tinjauan Tentang Flavonoid

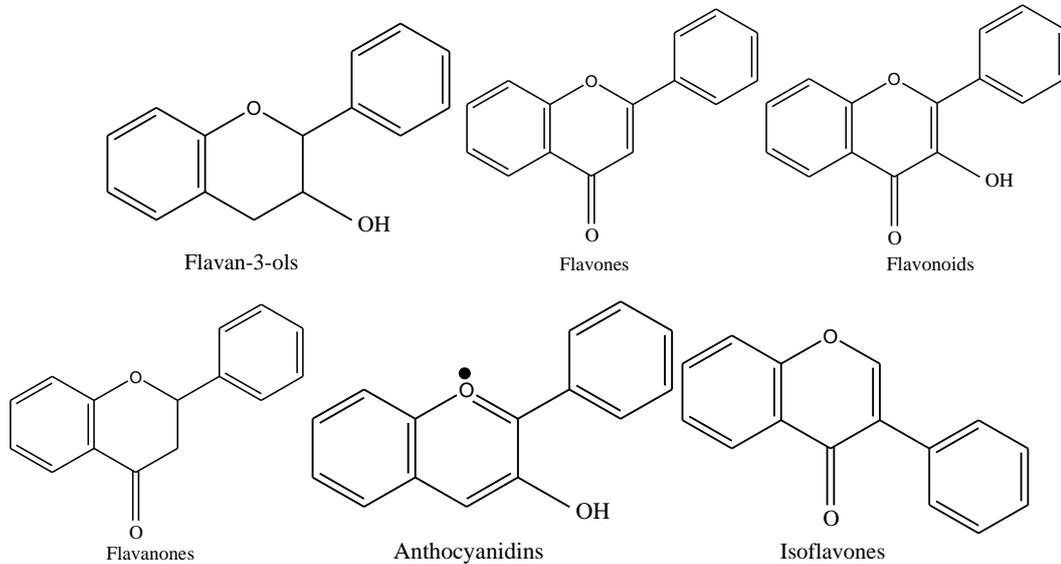
Flavonoid merupakan kelompok zat alami dengan struktur fenolik yang bervariasi, flavonoid dapat ditemukan pada buah-buahan, sayur, biji-bijian, kulit kayu, akar, batang, bunga, dan daun. Flavonoid merupakan komponen penting dalam berbagai produk kesehatan karena memiliki sangat banyak kegunaan bagi kesehatan, yaitu diantaranya aktivitas antioksidan, antiinflamasi, antimutagenik, dan anti karsinogenik. Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, artinya kerangka karbon yang dimiliki terdiri dari dua gugus C6 (cincin benzena tersubstitusi) disambungkan oleh rantai alifatik tiga karbon. (Tiang-Yang *et al.*, 2018).

Menurut (Arifin *et al.*, 2018) Di antara produk-produk alami, flavonoid adalah yang sangat menarik untuk dipelajari dan merupakan salah satu senyawa yang menjanjikan untuk pengobatan kanker, antioksidan, bakteri patogen, radang, disfungsi kardio-vaskular, dan lain-lain. Kemampuan dan bioaktivitas antioksidan dari flavonoid dapat meningkatkan peranan flavonoid dalam bidang obat-obatan. Metilasi dari flavonoid melalui kelompok hidroksil bebasnya atau atom C yang dapat meningkatkan stabilitas metaboliknya dan meningkatkan transportasi membran.

2.8.1 Klasifikasi Flavonoid

Menurut (Yang *et al.*, 2018) Ada beberapa subkelas flavonoid: flavanols, flavanon, flavon, isoflavon, antosianidin, dan flavonol. Pembagian dalam subkelas flavonoid didasarkan pada sifat-sifat struktural. Flavanol ditemukan dalam anggur merah dan anggur merah (*ex-catechins*), flavanon ditemukan pada sitrus (*ex-narigenin*), flavon (*ex-apigenin*) ditemukan dalam bumbu berdaun hijau, isoflavon ditemukan pada kedelai, dan pada hampir semua makanan flavonol ditemukan.

Flavonoid asal katekin terutama ditemukan pada teh hijau dan hitam dan anggur merah, sedangkan antosianin ditemukan pada stroberi dan buah beri lainnya.



Gambar 2. 5 Struktur Kimia dan Klasifikasi Flavonoid

2.9 Simplex Lattice Design (SLD)

Simplex Lattice Design merupakan salah satu rancangan penelitian untuk mengetahui profil efek campuran pada suatu parameter. Dasar pada rancangan ini adalah adanya dua variabel bebas A, B, dan C, Rancangan ini dibuat dengan memilih tiga kombinasi dan yang diamati respon yang didapat. Respon yang didapatkan haruslah mendekati tujuan yang telah ditetapkan sebelumnya baik maksimal ataupun minimal. Model matematika memiliki beberapa model sebagai berikut (Bolton, 1997):

1. Quatric

$$\begin{aligned}
 Y = & (A) + (B) + (C) + (AB) + (AC) + (BC) + (AB)(A - B) \\
 & + (AC)(A - C) + (BC)(B - C) + (A^2BC) + (AB^2C) \\
 & + (ABC^2) + (AB)(A - B)^2 + (AC)(A - C)^2 \\
 & + (BC)(B - C)^2
 \end{aligned} \tag{3-4}$$

2. Special Quatric

$$Y = A+B+C+(AB) + (AC) + (BC) + (A^2BC) + (AB^2C) + (ABC^2) \tag{3-5}$$

3. Cubic

$$Y = (A) + (B) + (C) + (AB) + (AC) + (BC) + (ABC) + (AB)(A - B) + (AC)(A - C) + (BC)(B - C) \quad (3-6)$$

4. Special cubic

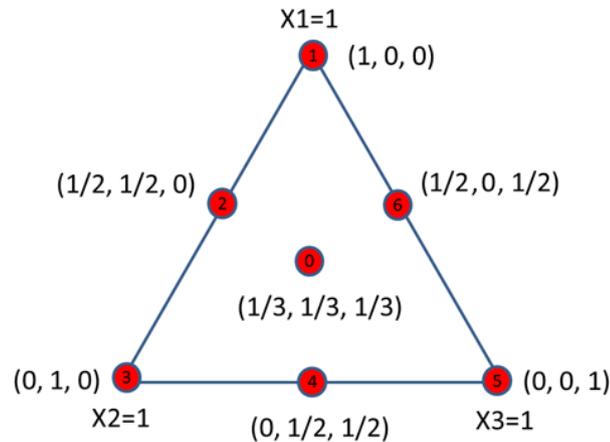
$$Y = (A) + (B) + (C) + (AB) + (AC) + (BC) + (ABC) \quad (3-7)$$

5. Linear

$$Y = (A) + (B) + (C) \quad (3-8)$$

6. Quadratic

$$Y = (A) + (B) + (C) + (AB) + (AC) + (BC) \quad (3-9)$$



Gambar 2.6 Kontur plot

Dalam proses optimasi model SLD, jumlah sesungguhnya suatu komponen dalam campuran dinyatakan sebagai proporsi yang merupakan bilangan nol atau positif dan tidak boleh berupa bilangan negatif. Jumlah seluruh proporsi semua komponen adalah 1. Jika X_1, X_2, \dots, X_q adalah proporsi komponen 1, 2, 3, ..., q, maka $0 \leq X_i \leq 1$. Jika terdapat 3 komponen ($q=3$) yaitu A, B, C maka digambarkan dalam bentuk dua dimensi berupa segitiga sama sisi seperti pada gambar 2.6 pada setiap sudut segitiga menunjukkan komponen tunggal dengan nilai proporsi sama dengan 1 (Bolton, 1997).

2.10 ANOVA (*Analysis of Variance*)

Analisis varian dapat dilakukan untuk menganalisis data yang berasal dari berbagai macam jenis dan desain penelitian. Analisis varian banyak dipergunakan pada penelitian-penelitian yang banyak melibatkan pengujian komparatif yaitu

menguji variabel terikat dengan cara membandingkannya pada kelompok-kelompok sampel independen yang diamati. Analisis varian saat ini banyak digunakan dalam penelitian survey dan penelitian eksperimen. Secara umum, analisis varians menguji dua varians (atau ragam) berdasarkan hipotesis nol bahwa kedua varians itu sama. Varians pertama adalah varians antar contoh (*among samples*) dan varians kedua adalah varians di dalam masing-masing contoh (*within samples*). Dengan ide semacam ini, analisis varians dengan dua contoh akan memberikan hasil yang sama dengan uji-t untuk dua rerata (*mean*).

Supaya sah (valid) dalam menafsirkan hasilnya, analisis varians menggantungkan diri pada asumsi yang harus dipenuhi dalam perancangan percobaan. Asumsi analisis varian yang harus dipenuhi adalah :

1. *Homogeneity of variance* : variabel dependen harus memiliki varian yang sama dalam setiap kategori variabel independen. Jika terdapat lebih dari satu variabel independen, maka harus ada *homogeneity of variance* di dalam *cell* yang dibentuk oleh variabel independen kategorikal.
2. Random sampling : untuk tujuan uji signifikansi, maka subyek di dalam setiap grup harus diambil secara acak
3. *Multivariate normality* : untuk tujuan uji signifikansi, maka variabel harus mengikuti distribusi normal multivariate. Variabel dependen terdistribusi normal dalam setiap kategori variabel independen. ANOVA masih tetap robust walaupun terdapat penyimpangan asumsi *multivariate normality*. (Ghozali, 2009)

Berdasarkan jumlah variabel yang diamati uji anova dapat dibagi menjadi 2 jenis yaitu *one-way* ANOVA dan *two-way* ANOVA. *One Way* Anova atau Analisis varians satu arah dipergunakan untuk menguji signifikansi perbedaan rata-rata hitung yang hanya mencakup satu klasifikasi atau satu variabel independen. Analisis varians berangkat dari adanya sejumlah variabilitas yang terdapat dalam data kelompok sampel yang akan diuji (Nurgiyantoro, 2002), sedangkan *Two Way* Anova yang diuji itu lebih dari satu macam. Anova dua arah dapat terdiri 1,2,3, atau lebih klasifikasi tergantung dari desain yang direncanakan. Uji Anova dapat digunakan untuk menyelidiki apakah ada

pengaruh faktor terhadap respon penelitian. Uji-uji yang dapat digunakan antara lain uji masing-masing faktor dan uji interaksi antar faktor.

Uji Anova dapat digunakan untuk menyelidiki apakah ada pengaruh faktor terhadap respon penelitian. Uji-uji yang dapat digunakan antara lain uji masing-masing faktor dan uji interaksi antar faktor.

1. Uji masing-masing faktor

Uji masing-masing faktor dilakukan untuk mengetahui apakah ada pengaruh pada masing-masing faktor secara terpisah terhadap respon.

Hipotesis:

H0: Faktor tidak memberi pengaruh pada respon

H1: Faktor memberi pengaruh pada respon

Pengambilan keputusan:

Jika nilai $p > \alpha$, maka H0 diterima

Jika nilai $p < \alpha$, maka H0 ditolak

2. Uji Interaksi antar Faktor

Uji interaksi antar faktor dilakukan untuk mengetahui apakah ada pengaruh yang ditimbulkan oleh kombinasi faktor terhadap respon. Uji ini terdiri atas *2-way interactions* dan *3-way interactions*.

A. *2-Way Interactions*

Hipotesis:

H0: Faktor *2-way interactions* tidak memberi pengaruh pada respon

H1: Faktor *2-Way Interactions* memberi pengaruh pada respon

Pengambilan keputusan:

Jika nilai $p > \alpha$, maka H0 diterima

Jika nilai $p < \alpha$, maka H0 ditolak

B. *3-Way Interactions*

Hipotesis:

H0: Faktor *3-Way Interactions* tidak memberi pengaruh pada respon

H1: Faktor *3-Way Interactions* memberi pengaruh pada respon

Pengambilan keputusan:

Jika nilai $p > \alpha$, maka H0 diterima

Jika nilai $p < \alpha$, maka H0 ditolak