

Bab II

Tinjauan Pustaka

2.1 Tumbuhan Daun Teh-tehan (*Acalypha siamensis*)

2.1.1 Morfologi

Tumbuhan teh-tehan atau ribang merupakan tanaman perdu, memiliki tinggi 0,5-6 m, ranting dan tangkai daun berambut vit abu-abu, pendek. Daun bertangkai pendek dengan pangkal membuka atau bentuk jantung, pada pangkal bertulang menjari, berbintik halus transparan, daun penumpu sempit bentuk lanset. Tanaman berumah 1, bunga dalam bulir tipis di ketiak, bulir betina lebih pendek, lebih tegak dan jumlahnya lebih sedikit dibandingkan bulir jantan. Bunga jantan duduk dalam gelendong sepanjang sumbu bulir. Sedangkan pada bunga betina masing-masing dalam ketiak daun pelindung berbagi dalam 5-13 taju yang sempit berbentuk menjari, tenda bunga terbagi 3, dengan taju merah, berambut, bakal buah beruang 3, dengan 3 tangkai putik berwarna putih yang berbagi dalam banyak taju berbentuk benang, putih kehijauan atau merah pucat. Batangnya berkayu dan berbentuk bulat. Termasuk dalam semak hias atau tanaman pagar. (Steenis, 2013)



Gambar 2.1 Tumbuhan Teh-tehan (Sagun, et al., 2010)

2.1.2 Klasifikasi

Tumbuhan daun teh-tehan memiliki klasifikasi sebagai berikut (Purwodi, 2019):

Kingdom	: Plantae
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Subclass	: Rosidae
Ordo	: Euphorbiales
Family	: Euphorbiaceae
Genus	: Acalypha
Spesies	: <i>Acalypha siamensis</i> Oliv.ex Gage

2.1.3 Kajian Fitokimia

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Pertiwi (2018), ekstrak etanolik daun teh-tehan (*Acalypha siamensis*) mengandung senyawa Fenolik dan Flavonoid. Untuk mengetahui komponen metabolit sekunder dari daun teh-tehan telah dilakukan skrining fitokimia untuk senyawa tanin, steroid, saponin, alkaloid dan flavonoid. Senyawa yang bekerja sebagai sebagai antibakteri adalah flavonoid, karena mekanisme kerja dari flavonoid adalah mendenaturasi protein sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran sel. Proses denaturasi ini dapat menyebabkan gangguan di dalam proses pembentukan sel sehingga dapat merubah komposisi protein dan dapat mengerutkan dinding sel bakteri yang akan terjadi lisis sel bakteri. Sedangkan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan adalah tanin, alkaloid dan steroid. (Imani, 2014)

2.1.4 Kajian Efek Farmakologis

Tumbuhan daun teh-tehan untuk sekarang ini masih terbatas pemanfaatannya, dimana masyarakat hanya menggunakan tanaman ini sebagai pagar atau pakan hewan ternak. Namun secara empiris digunakan sebagai obat malaria, dan pelancar peredaran darah (Hariana, 2013). Sedangkan secara *science* sudah dibuktikan bahwa ekstrak etanolik daun teh-tehan menunjukkan aktivitas antifungi pada jenis *Candida albicans* (Rohmatika, 2017).

2.2 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan senyawa aktif dari beberapa campuran senyawa dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Mukhriani, 2014). Dalam hal ini, selama proses ekstraksi berlangsung fungsi dari pelarut adalah sebagai cairan penyerap metabolit sekunder agar dapat keluar dari dalam sel tumbuhan atau simplisia. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan polaritas yang terdapat didalam gugus-gugus kimia tertentu yang dapat menyebabkan terjadinya penarikan oleh senyawa aktif melalui mekanisme difusi. Sesuai dengan prinsip “*like dissolves like*” dimana senyawa yang bersifat polar akan mudah tertarik apabila diberikan pelarut yang bersifat polar dan sebaliknya senyawa yang bersifat non polar mudah tertarik apabila diberikan senyawa bersifat non polar. Proses ekstraksi akan berakhir apabila terjadinya kesetimbangan konsentrasi antara senyawa dalam pelarut dan cairan intra sel (Gibbons, 2012).

Simplisia dapat dilakukan ekstraksi dengan akurat dan tepat dengan cara ekstraksi selektif dan ekstraksi total. Ekstraksi selektif dilakukan menggunakan ekstrak simplisia yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan pelarut non polar contohnya n-heksan, kloroform dan residu dari simplisia dapat diekstrak kembali dengan menggunakan pelarut yang lebih polar. Sedangkan ekstraksi total dilakukan menggunakan ekstrak yang diperoleh kemudian dilarutkan dengan pelarut polar contohnya alkohol (etanol, metanol). Hal ini disebabkan karena aktivitas dalam permeabilitas dinding sel yang tinggi sehingga dapat memfasilitasi proses ekstraksi terhadap metabolit dengan tingkat kepolaran yang tinggi dan menengah ke bawah (Gibbons, 2012).

Metode yang digunakan dalam ekstraksi ini adalah metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana untuk dilakukan yaitu dengan cara simplisia dimasukkan kedalam suatu wadah tertutup kemudian direndam dengan larutan penyari dan didiamkan pada suhu ruangan. Dalam melakukan proses ekstraksi ini, biasanya membutuhkan waktu kurang lebih 3 hari dan dilakukan pengadukan secara bertahap. Tujuan dilakukannya proses perendaman adalah untuk melunakkan dan menghancurkan dinding sel tumbuhan agar senyawa aktif yang

terdapat didalam simplisia mudah tertarik keluar dan larut dalam cairan penyari, sedangkan tujuan digunakannya suhu ruangan adalah untuk menghindari adanya kerusakan senyawa aktif akibat panas, selain itu adalah untuk menjaga kadar senyawa aktif agar tidak berkurang karena adanya panas (Azwanida, 2015)

Pemilihan metode maserasi adalah dikarenakan metode ekstraksi ini termasuk yang paling sederhana apabila dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain seperti refluks, soxhletasi, perkolasi, *supercritical extraction*, *microwave assisted extraction* (MAE), *solid phase extraction* (SPE), *supercritical fluid extraction* (SFE) dan lain sebagainya. Meskipun termasuk metode yang paling sederhana, maserasi juga memiliki kekurangan yaitu tidak adanya energi lain yang membantu dalam proses ekstraksi. Untuk mengatasinya maka digunakan pelarut yang sesuai karena pelarut tersebut merupakan faktor terpenting dalam keberhasilan proses ekstraksi. Selain itu, juga perlu diperhatikan jumlah pelarut karena apabila jumlah pelarut yang terlalu banyak dan terlalu sedikit akan mempengaruhi proses ekstraksi. Oleh karena itu, maka dilakukan pengukuran terlebih dahulu sebelum dilakukan proses ekstraksi yaitu dengan melakukan perbandingan jumlah simplisia dengan pelarut (Azwanida, 2015).

2.3 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan teknik pemisahan ekstrak hasil maserasi yang telah diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kental. Kemudian dari ekstrak kental tersebut dilarutkan dengan pelarut-pelarut tertentu dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda, sehingga masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda pula. Metode yang digunakan dalam fraksinasi ini adalah ekstraksi cair-cair, dimana dalam metode ini akan dihasilkan 2 fase yang dapat memisah. Hal ini dikarenakan adanya perbedaan massa jenis dari kedua jenis pelarut yang digunakan.

2.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi merupakan metode yang dapat digunakan untuk memisahkan dan mengidentifikasi komponen-komponen dalam suatu molekul yang memiliki sifat fisik dan kimia yang sama (King et al, 2006). Prinsip kerja dari kromatografi adalah adanya

interaksi molekul yang berbeda antara fase gerak dan fase diam. Medium yang digunakan dalam fase gerak berupa pelarut. Molekul akan bermigrasi dari fase gerak melewati fase diam yang akan terjadi pemisahan. Pemisahan ini disebabkan karena adanya perbedaan polaritas antara komponen, sehingga komponen yang bersifat polar akan lebih mudah larut di dalam fase gerak polar dibandingkan fase gerak non polar dan sebaliknya (Manz et al, 2004).

Berdasarkan fase diamnya, kromatografi terbagi atas beberapa jenis yaitu kromatografi adsorpsi, kromatografi partisi, kromatografi penukar ion, kromatografi permeasi dan kromatografi afinitas. Pada kromatografi adsorpsi fase gerak yang digunakan berupa larutan atau gas yang dapat diserap oleh permukaan zat padat sebagai fase diamnya. Prinsip kerjanya yaitu adanya penyerapan pada permukaan padat oleh fase geraknya. Kromatografi partisi metode yang digunakan larutan sebagai fase gerak maupun fase diamnya. Prinsip kerjanya berdasarkan perbedaan kelarutan antar zat terlarut. Kromatografi penukar ion menggunakan ion sebagai fase gerak dan fase diamnya. Prinsip kerjanya yaitu ion zat terlarut dari muatan yang berlawanan dalam fase gerak cair akan tertarik ke resin oleh gaya elektrostatis. Kromatografi permeasi biasa disebut juga penyerapan gel atau filtrasi gel dimana tidak terjadi interaksi antara fase diam dan fase gerak. Prinsip kerjanya yaitu larutan atau gas akan melewati gel berpori yang akan memisahkan komponen berdasarkan ukuran partikelnya. Kromatografi afinitas yaitu dengan pemisahan komponen berdasarkan interaksi spesifik antar komponen fase diam dan komponen fase gerak. Prinsip kerjanya yaitu dengan mengubah ion atau pH. (Yip, 1997).

Kromatografi lapis tipis terbagi atas *thin layer chromatography* (TLC) dan *high performance thin layer chromatography* (HPTLC) (Hubpages, 2015). Jenis kromatografi yang akan digunakan pada penelitian ini adalah Kromatografi lapis tipis dimana prinsip kerja dari KLT ini termasuk dalam kromatografi adsorpsi. Perbedaan antara kromatografi lapis tipis dengan kromatografi lainnya adalah pada KLT digunakan lapisan tipis yang tersusun atas silika gel berlapis-lapis atau potongan kaca yang dilapisi dengan alumina, logam maupun plastik yang kaku. Silika gel disini berfungsi sebagai fase diamnya dan sebagai komponen yang dapat disinari oleh sinar

UV. Fase gerak yang digunakan adalah pelarut yang sesuai dengan sifat fisikokimia dari senyawa (Clark, 2007). Prinsip kerja dari metode kromatografi lapis tipis yaitu pemisahannya terjadi berdasarkan perbedaan kelarutan antara komponen fase diam dan fase geraknya dimana komponen pada fase geraknya akan menggunakan prinsip kapiler dan akan melewati komponen pada fase diam (Hubpages, 2015). Dalam melakukan metode ini lamanya waktu yang dibutuhkan bergantung pada polaritas senyawa, jenis fase cair dan jenis fase padat (Coskun, 2016).

Prosedur kerja dari kromatografi lapis tipis ini dilakukan dengan cara fase diam yang berupa serbuk halus diaplikasikan merata dan secara tipis pada permukaan kaca. Kemudian ukuran serbuk yang digunakan dalam fase gerak harus memiliki rentang antara 10-15 μm . Pada pelat kaca yang sudah dilapisi dengan fase diam dilakukan penotolan dengan larutan sampel sampai membentuk titik lingkaran berdiameter 2-5 mm atau lebar pita 10-20 mm. Tempat penotolan harus berada 5 mm diatas fase gerak guna mencegah terlarutnya sampel dalam fase gerak (United State Pharmacopeia 40 National Formulary, 2017). Setelah dilakukan penotolan maka dilanjutkan dengan proses elusi dimana plat kaca tersebut dimasukkan kedalam chamber yang sudah terisi dengan fase gerak. Hasil dari elusi tersebut akan berakhir ketika fase gerak telah naik sampai batas atas. Hasil dari proses elusi diukur dan digunakan untuk penentuan nilai faktor retardasi (R_f) dimana berfungsi sebagai data kualitatif dari senyawa yang dihasilkan (Coskun, 2016). Pada penelitian ini akan digunakan metode Kromatografi Lapis Tipi Preparatif (KLTP), Pada kromatografi lapis tipis preparatif menggunakan pelat yang sudah diberi silika gel lebih besar daripada yang digunakan dalam analisis KLT yaitu berukuran 20 \times 40 cm atau 20 \times 20 cm (Sherma, 2006). Senyawa yang akan dipisahkan dilarutkan dalam pelarut yang sesuai kemudian ditotolkan pada salah satu garis sisi pelat secara tegak lurus dengan bantuan pipa kapiler. Kemudian pelat dielusi dengan eluen yang sesuai selanjutnya silika dikerok dari pelat. Tujuan dari penggunaan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif adalah untuk mendapatkan senyawa murni. (Sherma, 2006)

Tabel 2.1 Jenis-Jenis Sorben dalam Kromatografi Lapis Tipis dan Mekanisme Pemisahan (Ismail *and* Nielsen, 2010)

Sorben	Mekanisme Kromatografi	Aplikasi
Gel Silika	Adsorpsi	Steroid, asam amino, alkohol, hidrokarbon, lipid, aflatoksin, asam empedu, vitamin, alkaloid
Gel Silika RP	Fase Terbalik	Asam lemak, vitamin, steroid, hormon, karotenoid
Selulosa, kieselguhr	Partisi	Karbohidrat, gula, alkohol, asam amino, asam karboksilat, asam lemak
Aluminium Oksida	Adsorpsi	Amina, alkohol, steroid, lipid, aflatoksin, asam empedu, vitamin, alkaloid
Polietilenamin Selulosa	Penukar Ion	Asam nukleat, nukleotida, nukleosida, purin, pirimidin
Magnesium Silikat	Adsorpsi	Steroid, pestisida, lipid, alkaloid

2.5 Instrumen untuk Karakterisasi Senyawa

Proses karakterisasi senyawa yang akan dilakukan melalui beberapa tahapan yaitu diantaranya : (1) penentuan gugus-gugus fungsi yang terdapat di dalam senyawa tersebut; (2) penentuan rumus empiris senyawa, penentuan massa molekul, dan

penentuan rumus molekul; (3) pengidentifikasi adanya auksokrom dan kromofor; (4) penentuan posisi atom-atom di dalam molekul. Penentuan gugus fungsi dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer inframerah. Penentuan massa molekul dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer massa, pengidentifikasi gugus auksokrom dan kromofor dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis. Sedangkan penentuan posisi atom-atom dapat dilakukan dengan menggunakan instrumen spektrofotometer resonansi magnetik inti (Pavia et al, 2009).

2.5.1 Spektrofotometer Inframerah

Spektrofotometer Inframerah adalah instrumen yang digunakan untuk menganalisis gugus-gugus fungsi yang terdapat didalam suatu senyawa. Cahaya Inframerah terdiri dari beberapa bagian frekuensi radiasi elektromagnetik yang berbeda, dimana dalam setiap frekuensi dapat dilihat sebagai warna yang berbeda. Radiasi IR juga mengandung beberapa rentang frekuensi namun tidak dapat dilihat oleh mata. Pengukuran pada spektrum inframerah dapat dilakukan dalam daerah cahaya inframerah tengah (*mid-infrared*) yaitu pada panjang gelombang 2.5 - 50 μm atau bilangan gelombang 4000 - 200 cm^{-1} . Energi yang dihasilkan oleh radiasi ini akan menyebabkan vibrasi atau getaran pada molekul. Pita absorpsi IR sangat spesifik dan khas pada masing-masing tipe ikatan kimia atau gugus fungsi. Metoda ini sangat berguna untuk mengidentifikasi senyawa organik dan organometalik. Sebagai sumber cahaya digunakan adalah lampu Narnst glowers, tungsten, atau glowbars. Dispersi pada spektrofotometer IR menggunakan monokromator, yang berfungsi untuk menyeleksi atau pemilihan panjang gelombang (Dachriyanus, 2004).

Jika suatu frekuensi tertentu dari radiasi IR dilewatkan pada sampel suatu senyawa maka akan terjadi penyerapan frekuensi oleh senyawa tersebut. Detektor yang ditempatkan pada sisi lain dari senyawa digunakan untuk mendeteksi frekuensi yang dilewatkan pada sampel yang tidak diserap oleh senyawa. Banyaknya frekuensi yang melewati senyawa (yang tidak diserap) akan diukur sebagai persen transmittan.

Jika nilai persen transmitan 100 maka tidak ada frekuensi IR yang diserap oleh senyawa. Namun pada kenyataannya, selalu ada sedikit dari frekuensi ini yang diserap dan memberikan suatu transmitan sebanyak 95%. Transmitan 5% memiliki arti bahwa hampir seluruh frekuensi yang dilewatkan diserap oleh senyawa. Maka, serapan yang sangat tinggi ini akan memberikan informasi penting tentang ikatan dalam senyawa ini. Identifikasi gugus fungsi pada molekul organik dilakukan berdasarkan pada bobot molekul, energi potensial permukaan, dan *kopling vibronik* dari lingkungan sekitarnya. Hal menyebabkan adanya pergeseran bilangan gelombang energi yang diserap oleh suatu gugus fungsi (Shikha and Awasthi, 2015)

Tabel 2.2 Hubungan Jenis Gugus Fungsi dan Bilangan Gelombang Serapan pada Spektrofotometri Inframerah (Pavia et al, 2009)

Gugus Fungsi	Golongan Senyawa dan Tipe Vibrasi	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Intensitas		
C – H	Alkana	(<i>stretch</i>)	3000 – 2850	kuat	
	–CH ₃	(<i>bend</i>)	1450 dan 1375	sedang	
	–CH ₂ –	(<i>bend</i>)	1465	sedang	
	Alkena	(<i>stretch</i>)	3100 – 3000	sedang	
		(<i>bend</i>)	1000 – 650	kuat	
	Aromatik	(<i>stretch</i>)	3150 – 3050	kuat	
		(<i>bend</i>)	900 – 690	kuat	
		(<i>stretch</i>)	3300	kuat	
	Alkuna	(<i>stretch</i>)	3300	kuat	
	Aldehid		2900 – 2700	lemah	
C = C	Alkena		1680 - 1600	sedang – lemah	
	Aromatik		1600 dan 1475	sedang – lemah	
C ≡ C	Alkuna		2250 - 2100	sedang – lemah	
C = O	Aldehid		1740 – 1720	kuat	
	Keton		1725 – 1705	kuat	
	Asam Karboksilat		1725 – 1700	kuat	
	Ester		1750 – 1730	kuat	
	Amida		1680 – 1630	kuat	
	Anhidrida		1810 dan 1760	kuat	
	Klorida Asam		1800	kuat	
	C – O	Alkohol, Eter, Ester, Asam Karboksilat, Anhidrida		1300 - 1000	kuat
		O – H			
O – H	Alkohol, Fenol				
	Bebas		3650 – 3600	sedang	
	Ikatan Hidrogen		3400 – 3200	sedang	
	Asam Karboksilat		3400 - 2400	sedang	

N – H	Amina dan Amida	(<i>stretch</i>)	3500 – 3100	sedang
		(<i>bend</i>)	1640 - 1550	sedang - kuat



Gambar 2.2 Instrumen Spektrofotometer Inframerah

2.5.2 Spektrofotometer Massa

Spektrofotometer massa merupakan instrumen yang berfungsi untuk mengukur massa suatu molekul. Gerakan suatu atom atau molekul bisa didefleksikan oleh medan magnet. Agar bisa dipengaruhi oleh medan magnet maka atom atau molekul ini harus diubah menjadi bentuk ion. Partikel yang bermuatan dapat dipengaruhi oleh medan magnet sedangkan yang tidak bermuatan tidak dipengaruhi. Prinsip kerja dari instrumen ini adalah dengan melakukan ionisasi pada molekul sehingga diperoleh fragmen-fragmen ion dalam bentuk gas, ion-ion tersebut akan diuapkan dan pergerakannya dipercepat menggunakan medan elektromagnetik. Kemudian fragmen ion tersebut dapat dipisahkan dan ditentukan massanya oleh detektor. Detektor akan menghasilkan data berupa spektrum massa yang menunjukkan persen kelimpahan ion sebagai fungsi dari rasio *mass-to-charge* (m/z) (Pavia et al, 2009).

Spektrofotometer massa memiliki beberapa tahapan yaitu ionisasi, akselerasi, defleksi dan deteksi. Pada ionisasi, Molekul akan diionisasi yaitu dengan cara membuang satu atau lebih elektron agar dapat memberikan muatan positif. Terdapat beberapa cara dalam membuang elektron dari suatu molekul, salah satunya adalah dengan cara menembak dengan elektron lain yang berkecepatan tinggi. Metode ini disebut dengan metode *Electron Impact* (EI). Sampel yang sudah dalam bentuk uap akan dilewatkan pada ruang ionisasi. Koil logam yang sudah dipanaskan akan

menghasilkan elektron, dimana elektron ini akan tertarik oleh penangkap elektron sebagai plat bermuatan positif. Partikel sampel (atom atau molekul) akan ditembak dengan elektron sehingga elektron dari partikel akan lepas dan memberikan ion positif. Ion yang bermuatan positif ini akan didorong melewati mesin oleh penolak ion (*ion repeller*) berupa plat logam yang sedikit bermuatan positif. Selanjutnya, Ion yang sudah terbentuk akan diakselerasi sampai memiliki energy kinetik yang sama. Ion positif akan ditolak dari ruang ionisasi dan seluruh ion diakselerasikan menjadi sinar ion yang terfokus. Kemudian Ion didefleksikan (dibelokkan) oleh medan magnet sesuai dengan massanya. Semakin ringan massanya maka akan semakin terdefleksi. Besarnya nilai defleksi tergantung pada seberapa besar muatan positif pada ion atau dengan kata lain tergantung pada berapa elektron yang lepas. Semakin banyak elektron yang lepas maka ion tersebut semakin terdefleksi. Besarnya defleksi bergantung pada massa ion dan muatan ion, sehingga apabila digabungkan menjadi rasio massa/muatan (m/z). Tahapan akhir, Ion yang melewati mesin akan dideteksi secara elektrik. Hanya ion pada lintasan tertentu yang melewati mesin dan sampai pada detektor. Ion yang lain akan dikurangi dengan mengambil elektron dari dinding dan akan dikeluarkan dari spektrometer massa dengan pompa vakum. Ketika ion menyentuh kotak logam maka muatannya akan dinetralisir oleh elektron yang melompat dari logam ke ion. Aliran elektron dapat dideteksi sebagai arus listrik sehingga bisa dicatat. Semakin banyak ion yang mencapai kotak logam, maka semakin besar arus yang dihasilkan (Dachriyanus, 2004).

Biasanya spektrum dari spektrometer massa berupa “diagram batang”. Diagram ini menunjukkan besar relatif arus yang dihasilkan oleh ion dari beberapa variasi rasio massa/muatan. Ketika suatu uap senyawa dilewatkan ke dalam ruang ionisasi ini, maka zat tersebut dapat ditembakkan dengan elektron. Elektron ini mempunyai energi yang cukup untuk melemparkan elektron dalam senyawa sehingga akan memberikan ion positif. Ion ini disebut dengan ion molekul. Ion molekul ini disimbolkan dengan M^+ . Titik dalam versi kedua menggambarkan adanya elektron yang tidak berpasangan karena diambil pada proses ionisasi. Ion molekul yang tidak stabil dapat terpecah

menjadi fragmen-fragmen yang lebih kecil. Fragmen-fragmen kecil ini yang akan membentuk diagram batang.



Gambar 2.3 Instrumen Spektrofotometer Massa

2.5.3 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan salah satu instrumen yang bekerja dengan cara mengukur energi yang diperlukan untuk memicu terjadinya transisi elektronik pada suatu molekul ion anorganik atau kompleks di dalam larutan. Spektrum UV-Vis memiliki bentuk yang lebar yang digunakan untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan dapat kalkulasikan dengan cara mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer, dimana nilai yang absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi molar senyawa dan lebar sel (Pavia et al, 2009). Terjadinya proses transisi elektronik disebabkan karena adanya absorpsi energi dari gelombang elektromagnetik yang berada pada rentang panjang gelombang antara 200-400 nm untuk UV dan 400-800 nm untuk visibel. Sebagai sumber cahaya biasanya digunakan lampu deuterium atau hidrogen untuk pengukuran UV dan lampu tungsten untuk pengukuran Visibel. Panjang gelombang dapat memisah dari sumber cahaya oleh suatu monokromator (Field et al, 2007).

Ketika suatu atom atau molekul menyerap cahaya maka energi tersebut akan menyebabkan tereksitasinya elektron pada kulit terluar ke tingkat energi yang lebih tinggi. Tipe eksitasi dapat ditentukan pada panjang gelombang cahaya yang diserap. Sinar ultraviolet dan sinar tampak akan menyebabkan elektron tereksitasi ke orbital yang lebih tinggi. Terdapat kromofor yang berfungsi sebagai absorpsi cahaya. Kromofor yang dapat menyebabkan eksitasi dari σ ke σ^* adalah sistem yang mempunyai elektron σ pada orbital molekul. Senyawa senyawa yang hanya mempunyai orbital σ adalah senyawa organik jenuh yang tidak mempunyai pasangan elektron bebas. Transisi dari σ ke σ^* ini akan menghasilkan serapan pada λ_{maks} sekitar 150 nm. Transisi dari n ke σ^* menyerap pada λ_{maks} dari 200 nm, yang mampu diberikan oleh sistem dimana mempunyai elektron yang tidak berikatan dan adanya orbital σ pada molekul. Senyawa yang hanya mengandung n dan orbital σ pada molekul adalah senyawa organik jenuh yang mengandung satu atau lebih pasangan elektron bebas di dalam molekul. Kromofor yang memberikan transisi dari π ke π^* menyerap pada λ_{maks} kecil dari 200 nm (tidak terkonjugasi). Kromofor ini merupakan tipe transisi dari sistem yang mengandung elektron π pada orbital molekulnya, sedangkan kromofor yang memberikan transisi dari n ke π^* memberikan serapan pada Panjang gelombang maksimal 300 nm.

Hubungan antara energi ikatan dengan transisi elektron yaitu $\sigma > \pi > n > \pi^* > \sigma^*$. Berdasarkan energi yang dibutuhkan, maka transisi dari σ ke σ^* membutuhkan energi yang paling besar (Dachriyanus, 2004). Dapat dikatakan bahwa semakin banyak gugus kromofor dalam suatu molekul maka dapat menurunkan energi tereksitasi sehingga dapat menyebabkan penyerapan yang maksimal pada panjang gelombang yang lebih besar. Besarnya intensitas penyerapan dapat meningkat apabila kromofor mengandung pengganti atom hidrogen yang disebut dengan auksokrom (Pavia et al, 2009).



Gambar 2.4 Instrumen Spektrofotometer UV-Vis

2.5.4 Spektrometer Resonansi Magnetik Inti

Spektrofotometer resonansi magnetik inti (NMR) merupakan instrumen yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis-jenis atom berdasarkan perbedaan sifat magnetnya. Inti atom-atom tertentu akan mempunyai spin, yang berputar dan menghasilkan momen magnetik sepanjang aksis spin. Jika inti yang berputar ini diletakkan di dalam medan magnet, maka sesuai dengan kalkulasi kuantum mekanik, momen magnetiknya akan searah (paralel; mempunyai energi yang rendah) atau berlawanan arah (antiparalel, mempunyai energi yang tinggi) dengan arah medan magnet yang diberikan. Jika sejumlah energi diberikan kepada inti yang berada dalam medan magnet tersebut, maka inti yang berada pada keadaan paralel akan berubah arahnya menjadi antiparalel (beresonansi) (Dachriyanus, 2004). Instrumen ini bekerja dengan cara mengukur besarnya perubahan frekuensi yang terjadi akibat resonansi yang terjadi. Meskipun pengukuran dapat dilakukan pada berbagai macam jenis inti, pengukuran terhadap molekul organik umumnya dilakukan dengan batasan pada proton atau hidrogen dan karbon (Pavia et al, 2009). Proses identifikasi dengan menggunakan spektrometer NMR dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai frekuensi gelombang elektromagnetik. Semakin tinggi frekuensi gelombang yang diaplikasikan maka akan menimbulkan semakin banyak kelebihan inti. Teknik ini dapat dilakukan untuk mengetahui struktur molekul berupa padatan atau larutan secara dua dimensi, yaitu dengan teknik HMBC dan HMQC dimana tujuannya adalah untuk

pendeteksi korelasi antara proton dengan karbon. Hal ini yang dapat memungkinkan metode identifikasi yang lebih sensitif dan respon yang lebih kuat (Pavia et al, 2009).



Gambar 2.5 Instrumen Spektrofotometer Resonansi Magnetik Inti (NMR)

2.5.4.1 Proton-NMR

Spektroskopi proton resonansi magnetik inti (^1H -NMR) dapat menghasilkan data tentang jumlah proton atau hidrogen pada suatu senyawa yang dianalisis, sehingga akan terbentuk sinyal yang berbeda dan menunjukkan berapa banyak jenis proton yang muncul. Oleh karena itu pelarut untuk pengukuran RMI ini harus inert dan tanpa proton (Shriner, et al., 2004). Pergeseran kimia atom hidrogen berbeda-beda tergantung pada lingkungan kimia (Silverstein, et al., 2005). Daerah pergeseran gelombang dibagi menjadi 2 yaitu *up field* (0-4 ppm) dan *down field* (5-15 ppm). Besarnya nilai pergeseran kimia dipengaruhi oleh kondisi medan magnet inti atom. Proton yang terletak berdekatan dengan atom elektronegatif cenderung memiliki pergeseran kimia yang lebih besar.

Tabel 2.3 Rentang Pergeseran Kimia ^1H pada Molekul Organik (Field et al, 2007)

Gugus	Pergeseran Kimia ^1H (ppm terhadap TMS)
Tetrametilsilan (TMS)	0
Metil	0,8 – 1,2

Metilen	1,0 – 1,5
Metin	1,2 – 1,8
Proton asetenik	2 – 3,5
Proton olefinic	5 – 8
Proton aromatic atau heterosiklik	6 – 9
Proton aldehida	9 – 10

Hasil pengukuran dengan $^1\text{H-NMR}$ menghasilkan data berupa puncak-puncak integral pada pergeseran kimia tertentu. Tinggi dari integral yang terukur memiliki nilai yang proporsional terhadap luas daerah di bawah puncak dan mewakili jumlah fraksi proton tertentu. Selain itu, setiap proton dapat merasakan jumlah proton sejenis yang terikat pada atom karbon disebelahnya. Interaksi yang terjadi menghasilkan suatu resonansi sehingga terjadi pemecahan puncak. Pemecahan puncak yang terjadi pada $^1\text{H-NMR}$ terjadi dengan mengikuti aturan (n+1) (Pavia et al, 2009). Dengan demikian, hasil interpretasi data dari $^1\text{H-NMR}$ memberikan informasi tentang jenis proton, jumlah proton, dan posisi proton dalam suatu molekul organik.

2.5.4.2 Carbon-NMR

Spektroskopi karbon resonansi magnetik inti ($^{13}\text{C-NMR}$) dapat mengetahui tentang atom karbon pada senyawa yang akan dianalisis. (Jacobsen, 2007). Dari spektroskopi karbon resonansi magnetik inti ($^{13}\text{C-NMR}$) dapat diketahui jumlah sinyal karbon yang muncul seperti CH_3 , CH_2 , CH , atau C dan pergeseran kimia dari masing-masing sinyal sehingga akan menunjukkan lingkungan elektronik masing-masing atom carbon. Tingginya sinyal tidak selalu berkorelasi dengan jumlah karbon. Biasanya atom karbon dengan dua atau tiga hidrogen memberikan sinyal yang kuat, sementara karbon tanpa hidrogen memberikan sinyal yang lemah (Shriner, 2004).

Tabel 2.4 Perkiraan Pergeseran Kimia Isotop ^{13}C Berdasarkan Jenis Substituen (Pavia et al, 2009)

Gugus	Pergeseran Kimia ^{13}C (ppm terhadap TMS)
-------	---

Tetrametilsilan (TMS)		0
Karbon jenuh (sp^3), tanpa gugus elektronegatif	$R - CH_3$	8 – 30
	$R - CH_2 - R$	15 – 55
	R_3CH atau R_4C	20 – 60
Karbon jenuh (sp^3), ada gugus elektronegatif	$R_3C - O -$	40 – 80
	$R_3C - Cl$	35 – 80
	$R_3C - Br$	25 – 65
Karbon alkuna (sp)	$C \equiv C$	65 – 90
Karbon tidak jenuh (sp^2)	$R_2C = CR_2$	100 – 150
Karbon cincin aromatik	C_6H_6	110 – 175
Karbonil	Asam, Ester, Amida, Anhidrida	155 – 185
	Aldehida dan Keton	185 – 220

Identifikasi jumlah proton yang terdapat pada suatu atom karbon dapat ditentukan pada pola pemecahan puncak NMR. Hal ini berbeda dengan 1H -NMR, dimana pemecahan ini secara langsung menunjukkan jumlah proton yang terikat pada karbon. Pemecahan pada ^{13}C -NMR mampu menunjukkan jumlah proton yang terikat pada masing-masing atom karbon dan banyaknya puncak yang diperoleh juga menimbulkan masalah dalam mengidentifikasi data. Oleh karena itu, data spektra yang diperoleh perlu dilakukan eliminasi puncak-puncak proton. Dengan demikian dapat diketahui puncak karbon yang terbentuk secara spesifik (Pavia et al, 2009).

2.6 Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme uniseluler yang termasuk dalam kerajaan protista. Mikroorganisme tersebut memiliki DNA maupun RNA yang berfungsi sebagai kelangsungan hidupnya. Bakteri memiliki ukuran yang sangat kecil yaitu berkisar antara 2–5 μm x 0,2–1,5 μm . Suatu sel bakteri hanya memiliki penyusun sebagai berikut: sebuah kromosom sirkuler, plasmid, ribosom 70S (50S + 30S), dinding sel, dan asam muramat (Parija, 2012). Mekanisme pertahanan pertama pada bakteri dilakukan oleh dinding sel. Dinding sel bakteri tersusun atas peptidoglikan dan rantai peptida pendek. Peptidoglikan merupakan disakarida yang terdiri atas derivat *N*-asetilglukosamin dan *N*-asetilmuramat. Pada bagian *N*-asetilmuramat terdapat rantai samping tetrapeptida yang terdiri atas asam *D*-glutamat dan *L*-alanin dengan asam mesodiaminopimelat (bakteri Gram-negatif) dan *L*-lisin (bakteri Gram-positif). Rantai

tetrapeptida dihubungkan oleh jembatan pentaglisin, tetapi hal ini tidak dimiliki oleh bakteri Gram-negatif (Parija, 2012).

Bakteri dibagi menjadi 2 golongan, yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri ini dapat ditentukan menggunakan teknik pewarnaan bakteri. Bakteri diwarnai dengan zat warna yodium dan violet, dibilas dengan alkohol, kemudian diwarnai lagi dengan zat warna merah. Di dalam struktur dinding sel ini yang akan menentukan respon pewarnaan. Bakteri gram positif yang sebagian besar dinding selnya terdiri dari peptidoglikan yang akan mengikat warna violet. Sedangkan pada bakteri gram negatif memiliki lebih sedikit peptidoglikan, yang terletak di suatu gel periplasmik antara membran plasma dan suatu membran bagian luar. Zat warna violet yang digunakan dalam pewarnaan gram sangat mudah dibilas oleh alkohol pada bakteri gram negatif, tetapi selnya tetap menahan zat warna merah (Campbell et al., 2003).

Tabel 2.5 Perbedaan Bakteri Gram Positif dan Bakteri Gram Negatif (Pelczar et al., 1986)

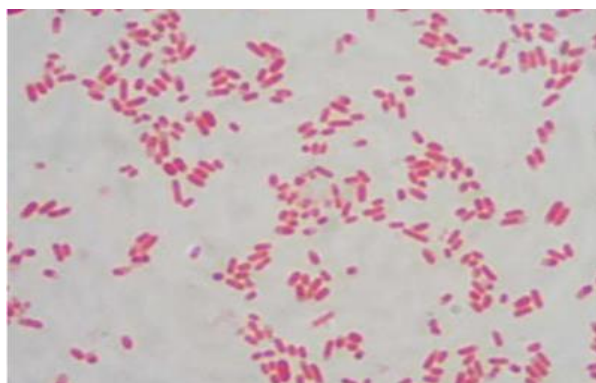
Ciri-ciri	Jenis Bakteri	
	Gram Positif	Gran Negatif
Struktur dinding sel	- Tebal (15 - 80 nm) - Berlapis tunggal (mono)	- Tipis (10 - 15 nm) - Berlapis tiga (multi)
Komposisi dinding sel	- Kandungan lipid rendah (1- 4%). - Peptidoglikan sebagai lapisan tunggal, merupakan komponen utama bakteri dan jumlahnya lebih dari 50 % berat kering sel bakteri. - Memiliki asam tekoat	- Kandungan lipid tinggi (11 - 22%). - Peptidoglikan terdapat di dalam lapisan kaku sebelah dalam, jumlahnya sedikit sekitar 10 % berat kering. - Tidak memiliki asam tekoat.
Kerentanan terhadap penisilin	Lebih rentan	Kurang rentan

Tabel 2.5 (lanjutan)

Penghambatan pertumbuhan oleh zat-zat warna dasar, misalnya ungu kristal	Pertumbuhan dihambat dengan nyata	Pertumbuhan tidak begitu dihambat
Persyaratan nutrisi Resisitn terhadap gangguan fisik	Relatif rumit Lebih resisten	Relatif sederhana Kurang resisten

2.6.1 *Escherichia coli*

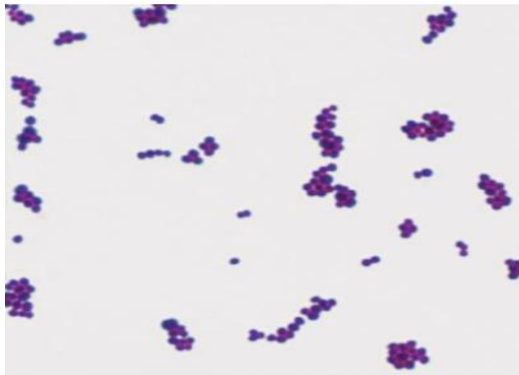
Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Jawetz et al., 2012). *E. coli* adalah anggota flora normal usus. *E. coli* berperan penting dalam sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu dan penyerapan zat-zat makanan. *E. coli* termasuk ke dalam bakteri heterotrof yang memperoleh makanan berupa zat organik dari lingkungannya karena tidak dapat menyusun sendiri zat organik yang dibutuhkan oleh bakteri *Escherichia coli* (Norajit et al., 2007). Media pertumbuhan yang digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA) selama 18 jam pada suhu maksimum sehingga menghasilkan koloni berwarna putih keabu-abuan. Pertumbuhan optimum terjadi pada kondisi suhu 37 – 40°C dan pH 7,2. Pada kondisi tersebut, replikasi bakteri dapat berlangsung setiap 20 menit (Jang et al, 2017; Parija, 2012).



Gambar .2.6 Bakteri *Escherichia coli* (Jawetz et al., 2012)

2.6.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang berdiameter 0,5-1,5 μ , tidak membentuk spora dan tidak bergerak. Pada media biakan, bakteri ini berbentuk bulat yang terlihat tunggal, berkelompok atau bahkan dapat tersusun seperti rantai. Beberapa strain dari bakteri ini memiliki kapsul. (Vasanthakumari, 2007) bakteri ini termasuk dalam bakteri aerob dan anaerob fakultatif namun dapat tumbuh juga pada kondisi bebas oksigen. Pertumbuhan dan kelangsungan hidup *Staphylococcus aureus* tergantung pada sejumlah faktor lingkungan seperti suhu, aktivitas air, pH, adanya oksigen dan komposisi makanan. Pertumbuhan secara maksimum terjadi pada suhu 37-40°C dan pH 7 (Parija, 2012). Media pertumbuhan yang biasa digunakan adalah *Nutrient Agar* (NA). Dimana dalam kondisi ini akan menghasilkan koloni berdiameter 2-4 mm dan berwarna kuning keemasan. Bakteri ini dapat bertahan pada suhu 60°C selama kurang lebih dari 30 menit sehingga dalam proses penanaman harus dilakukan pada suhu di bawah suhu tersebut (Parija, 2012)



Gambar 2.7 Bakteri *Staphylococcus aureus* (Jawetz, 2013)

2.7 Aktivitas Antibakteri

2.7.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang berfungsi untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan reproduksi bakteri. Suatu zat antibakteri yang baik harus memiliki sifat toksisitas yang selektif, dimana obat tersebut berbahaya untuk parasit tetapi tidak membahayakan sel inang. Mekanisme kerja dari bakteri ini dapat bekerja membunuh pertumbuhan bakteri atau yang disebut dengan bakteriosida dan bekerja

menghambat pertumbuhan bakteri atau yang disebut dengan bakteriostatik. (Talaro, 2008).

Berdasarkan daya menghambat dan membunuhnya, antibakteri dapat dikelompokkan menjadi dua jenis yaitu bakteri berspektrum sempit (*narrow spectrum*) dan bakteri berspektrum luas (*broad spectrum*). Antibakteri yang berspektrum luas dapat bekerja dengan baik pada bakteri gram positif dan negatif, sedangkan bakteri berspektrum sempit hanya bekerja dengan baik pada salah satu jenis bakteri gram positif atau gram negatif (Talaro, 2008).

Secara lebih spesifik, mekanisme kerja senyawa antibakteri terdiri dari : Penghambatan terhadap sintesis dinding sel, Penghambatan terhadap fungsi membran sel, Penghambatan terhadap sintesis protein dan Penghambatan terhadap sintesis asam nukleat (Talaro, 2008). Dinding sel bakteri mengandung peptidoglikan yang berisi gula amino *N-acetylglucosamine* dan *asam acetylmuramic* (Jawetz et al., 2005). Dinding sel bakteri ini berfungsi untuk memberi bentuk tubuh bakteri dan pelindung dari tekanan osmotik di dalam dan diluar sel yang tinggi. Mekanisme antibakteri akan bereaksi dengan enzim-enzim yang dibutuhkan pada proses sintesis sehingga dapat menyebabkan pembentukan dinding sel yang lemah sehingga terjadi pemecahan osmotik (Talaro, 2008). Sitoplasma didalam bakteri berfungsi sebagai barier permeabilitas selektif, transpor aktif dan mengatur komposisi internal sel. Jika fungsi dari membran sel dirusak maka akan menyebabkan keluarnya makromolekul dan ion dari sel kemudian sel akan rusak dan terjadi kematian (Jawetz et al., 2005). Antibakteri akan berikatan dengan membran fosfolipid yang akan menyebabkan terjadi pemecahan protein dan basa nitrogen sehingga membran bakteri pecah dan terjadi kematian (Talaro, 2008).

Antibakteri bekerja dengan menghambat translasi atau sintesis protein dengan bereaksi pada ribosom RNA. Mekanisme kerjanya dengan menghalangi ikatan pada RNA tempat spesifik ribosom selama pemanjangan rantai peptida. Tempat ribosom bakteri terdapat pada sub unit 70S yang terdiri dari ribosom 30S dan ribosom 50S. (Talaro, 2008; Jawetz et al., 2005). Pembentukan DNA dan RNA berperan penting dalam metabolisme protein. Antibakteri bekerja dengan menginterferensi sintesis asam

nukleat dengan menghambat sinteisi nukleotida, menghambat replikasi, atau menghentikan transkripsi. Kemudian obat akan berikatan kuat pada enzim DNA dependen RNA polymerase bakteri sehingga menghambat sintesis RNA bakteri yang menyebabkan terjadi kematian pada bakteri (Talaro, 2008; Jawetz et al., 2005).

2.7.2 Metode Uji Aktivitas Antibakteri

2.7.2.1 *Disc Diffusion Test*

Disc diffusion test adalah metode uji yang dilakukan pada media pada yang berisi isolat bakteri. Pengujian ini dilakukan dengan cara zat yang akan diuji diserapkan ke dalam cakram kertas dengan meneteskan pada cakram kertas kosong larutan antibakteri sejumlah volume tertentu dengan kadar tertentu. Cakram kertas kemudian diletakkan diatas permukaan agar apadat yang telah diolesi bakteri, diinkubasi selamat 18-24 jam dengan suhu 37°C. Konsentrasi senyawa antibakteri di daerah sekitar cakram kertas yang tinggi dapat menyebabkan bertambahnya jarak di sekitar cakram kertas. Dengan demikian aktivitas antibakteri dapat dilihat dengan mengukur diameter hambat di sekeliling cakram kertas. . Metode Kirby-Bauer *disc diffusion* dilakukan dengan mengujikan senyawa uji pada koloni uji dan koloni kontrol pada media terpisah. Besarnya aktivitas antibakteri dinyatakan sebagai diameter zona penghambatan (Parija, 2012)

2.7.2.2 *Dilution Test*

Metode uji *dilution test* dilakukan dengan beberapa cara yaitu,(1) *tube dilution method* dan (2) *agar dilution method*. Pada metode pertama, senyawa antibakteri disuspensikan kedalam agar kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan beberapa tabung reaksi. Selanjutnya diinokulasi bakteri uji, setelah dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-29 jam. Kemudian dilakukan pengamatan hasil, jika terbentuk warna yang keruh pada tabung menunjukkan terjadinya pertumbuhan bakteri sedangkan terbentuknya warna yang jernih menunjukkan adanya zat antibakteri yang bekerja (Shanab et al, (2006). Sedangkan pada metode kedua, zat antibakteri dicampur denan agar steril yang masih cair dengan suhu rendah ($\pm 45^{\circ}\text{C}$) dengan menggunakan

beberapa konsentrasi. Larutan tersebut kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sampai memadat dan diolekan bakteri uji pada perukannya. Penentuan penghambatan dapat diketahui dengan tidak adanya bakteri pada permukaan (Yuliani, 2001).

2.7.3 Pehitungan Jumlah Bakteri

Jumlah bakteri dapat dihitung melalui pengukuran konsentrasi sel atau konsentrasi biomassa. Pengamatan ini dilakukan dengan menggunakan metode *total count* dan *viable count*. Pada metode *total count*, perhitungan dilakukan pada sampel tanpa membedakan sel yang hidup dan mati. Metode ini dilakukan melalui pengamatan di bawah mikroskop dalam *counting chamber* atau perbandingan kekeruhan dengan larutan standar, sedangkan, *viable count* dilakukan untuk mengukur jumlah bakteri hidup. Metode ini dilakukan dengan menggunakan metode *plate* dan diamati jumlah koloni yang tumbuh (Parija, 2012)

2.8 Aktivitas Antioksidan

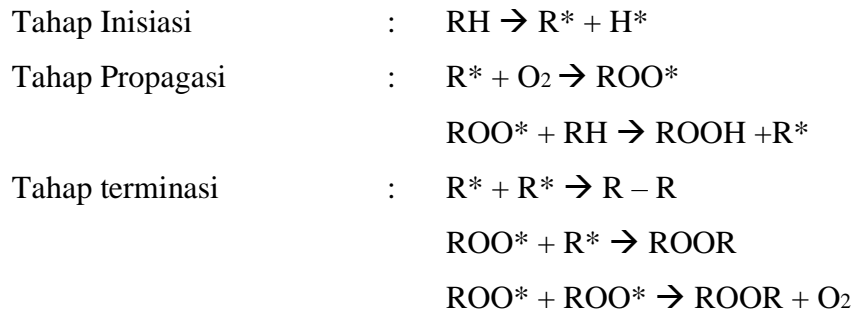
2.8.1 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang kekurangan elektron dalam strukturnya sehingga molekul tersebut menjadi tidak stabil dan akan berusaha untuk mengambil elektron dari molekul lain. Radikal bebas ini dapat dihasilkan oleh faktor internal dan eksternal, sebagai salah satu contoh pada faktor internal adalah hasil metabolisme didalam tubuh, sedangkan faktor eksternal dapat berasal dari sinar ultraviolet, asap rokok, senyawa kimia dalam makanan dan polutan lainnya. Radikal bebas ini akan bereaksi dengan senyawa yang ada didalam tubuh seperti lemak, DNA dan protein sehingga memicu terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif terjadi sebagai akibat adanya jumlah radikal bebas didalam tubuh melebihi kapasitasnya sehingga perlu dinetralkan antara antioksidan dan radikal bebas untuk pencegahan stres oksidatif. Radikal bebas ini dapat menyebabkan penyakit kronis sehingga membutuhkan waktu yang panjang untuk menyembuhkannya. Contohnya penyakit kanker dan serangan

jantung. Untuk mengatasi dan mencegah penyakit kronis ini maka diperlukan antioksidan. (Ahmadinejad et al, 2017).

2.8.2 Mekanisme Kerja Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang pada konsentrasi rendah secara signifikan dapat menghambat atau mencegah oksidasi substrat dalam reaksi rantai (Halliwell dan Whitemann, 2004; Leong dan Shui, 2002). Antioksidan bekerja melalui mekanisme transfer atom hidrogen dan transfer elektron tunggal. Antioksidan dapat melindungi sel-sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul tidak stabil yang dikenal sebagai radikal bebas. Antioksidan dapat mendonorkan elektronnya kepada molekul radikal bebas, sehingga dapat menstabilkan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai. Reaksi berantai ini terdiri dari 3 tahapan yaitu : Inisiasi, propagasi dan terminasi.

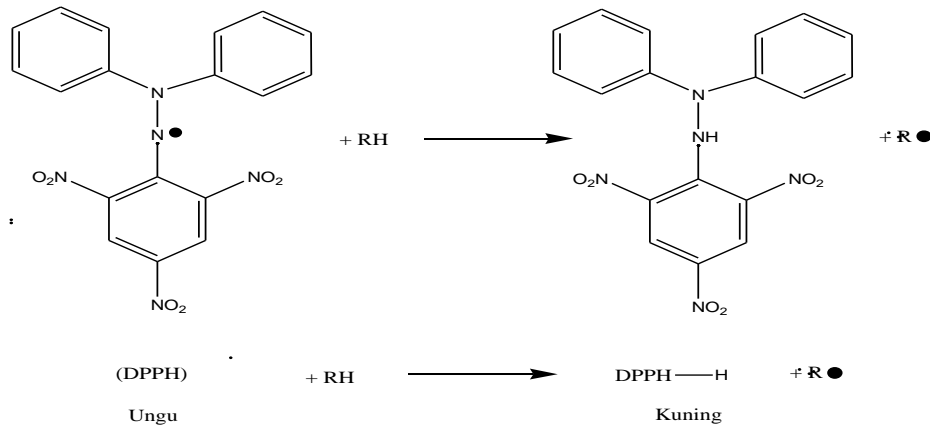


Pada tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal bebas (R^*) yang sangat reaktif, karena (RH) melepaskan satu atom hidrogen, hal ini dapat disebabkan adanya cahaya, oksigen atau panas. Pada tahap propagasi, radikal (R^*) akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (ROO^*). Radikal peroksi akan menyerang RH (misalnya pada asam lemak) yang dapat menghasilkan hidroperoksida dan radikal baru. Hidrogen peroksida yang terbentuk ini memiliki sifat yang tidak stabil dan dapat terdegradasi untuk menghasilkan senyawa-senyawa karbonil rantai pendek seperti aldehida dan keton (Nugroho, 2007). Tanpa adanya antioksidan, reaksi oksidasi lemak akan berlanjut sampai tahap terminasi, sehingga antar radikal bebas dapat bereaksi untuk membentuk senyawa yang kompleks. Sehingga dengan adanya antioksidan maka dapat memberikan atom hidrogen atau elektron pada radikal bebas (R^* , ROO^*),

mengubahnya ke bentuk yang lebih stabil RH. Sementara turunan radikal antioksidan (A*) memiliki keadaan lebih stabil dibanding radikal semula R* (Yuswantina, 2009).

2.8.3 Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan dengan DPPH

Uji aktivitas senyawa antioksidan umumnya digunakan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Pada metode ini antioksidan akan bereaksi dengan radikal bebas DPPH dengan cara memberikan atom hidrogen sehingga menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dimana warna ungu berubah menjadi tidak berwarna atau warna kuning. Intensitas warna ini dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Perubahan tersebut terjadi karena reaksi reduksi saat DPPH mengikat elektron atau atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa antioksidan (Liang *and* Kitts, 2014; Akar *et al*, 2017). Pada metode ini yang diukur adalah aktivitas penghambatan radikal bebasnya.



Gambar

2.8 Reaksi Penghambatan Radikal DPPH (Schwarz *et al*, 2001)

Metode ini tidak spesifik untuk komponen antioksidan tertentu, tetapi untuk semua senyawa antioksidan dalam sampel. DPPH digunakan secara luas untuk menguji aktivitas antioksidan makanan. Warna berubah menjadi kuning saat radikal DPPH menjadi berpasangan dengan atom hidrogen dari antioksidan membentuk DPPH-H. Aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan rumus berikut ini.

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\% \quad (2-1)$$

Berdasarkan rumus tersebut, semakin kecil nilai absorbansi maka semakin tinggi besar aktivitas sebagai penangkapan radikal. Besarnya nilai aktivitas antioksidan dinyatakan secara kuantitatif dengan IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi larutan uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. (Shivaprasad et al, 2005).

2.9 Aktivitas Uji *in silico*

2.9.1 *Superoxide dismutase (SOD)*

Superoksida dismutase adalah enzim yang mengkatalisis dismutasi ion superoksida radikal (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan molekul oksigen O_2 . Berdasarkan kofaktor logam dan distribusinya di dalam tubuh, SOD terbagi atas 3 macam, yaitu *copper, zinc superoxide dismutase* (Cu, Zn-SOD) yang umumnya terdapat dalam sitoplasma eukariot, *manganese superoxide dismutase* (Mn-SOD) yang biasanya terdapat pada mitokondria organisme aerobik, iron superoxide dismutase (Fe-SOD) yang biasanya terdapat pada prokariot (Mates et al. 1999; Nurwati 2002), dan *extra-cellular superoxide dismutase* (ec-SOD) yang banyak ditemukan pada cairan ekstraselular pada mamalia (West dan Prohaska 2004). SOD tergolong enzim yang sangat stabil karena tiap subunit bergabung oleh ikatan non-kovalen dan terangkai oleh rantai disulfida (Fridovich 1986). Enzim ini memainkan peranan yang sangat penting pada garis depan sistem pertahanan antioksidan (Mates et al. 1999).

2.9.2 *Glutation Peroksidase (GPX)*

Glutation Peroksidase adalah enzim yang berperan aktif dalam menghilangkan H_2O_2 dalam tubuh dan digunakan untuk merubah glutation (GSH) menjadi glutation teroksidasi (GSSG). Selain mengkatalis H_2O_2 , GPX juga dapat memecah senyawa peroksida lainnya, yaitu dengan menggunakan GSH sebagai donor hidrogen. Hasil reduksi semua senyawa peroksida tersebut adalah alkohol (Suhartono, 2007). Aktivitas GPx memerlukan glutation sebagai kosubstrat dan enzim glutation reduktase untuk mengubah glutation teroksidasi (GSSG) menjadi bentuk tereduksi (GSH). Logam Se

dalam GPX berfungsi sebagai katalitik pada bagian aktifnya, kemudian memusnahkan H₂O₂. Enzim tersebut juga dapat menyingkirkan lipid peroksida dari membran sel (Winarsi, 2007). Enzim *glutation reduktase* ini juga mendukung aktivitas enzim SOD bersama-sama dengan enzim katalasedan menjaga konsentrasi oksigen akhir agar stabil dan tidak berubah menjadi pro-oksidan.

2.9.3 *Peptidoglycan glycosyltransferase* (PGT)

Dinding sel bakteri memiliki penyusun utama berupa peptidoglikan. *Peptidoglycan glycosyltransferase* (PGT) merupakan suatu enzim katalitik yang bekerja pada proses biosintesis peptidoglikan. Enzim tersebut mengkatalisis proses transfer disakarida-peptida dari lipid II kepada rantai glikan. Hal ini akan menyebabkan rantai glikan menempel pada permukaan membran sel bakteri. Penambatan molekul pada enzim tersebut dapat mengganggu proses penempelan glikan pada membran sel bakteri sehingga mempengaruhi integritas dinding sel bakteri (Mesleh *et al*, 2016).

2.9.4 *D-alanil D-alanin dekarboksipeptidase* (DACA)

D-alanil D-alanin dekarboksipeptidase adalah enzim bakteri yang mengkatalisis transfer RL-aca-D-alanyl moietyRL-aca-D-alanyl-Dalanyl carbonyl donor ke-OH dari situs aktif mereka dan ke akseptor akhir. Ia terlibat dalam biosintesis dinding sel bakteri, yaitu, transpeptidasi yang mengikat silang rantai samping peptida untaian peptidoglikan. [Antibiotik penisilin](#) terikat secara ireversibel dan menghambat aktivitas enzim transpeptidase dengan membentuk zat antara penicilloyl-enzim yang sangat stabil. Karena interaksi antara penisilin dan transpeptidase, enzim ini juga dikenal sebagai [protein pengikat penisilin](#) (PBP). DD-transpeptidase secara mekanis mirip dengan reaksi proteolitik dari keluarga protein tripsin. Pengikatan silang [bagian-bagian](#) peptidil dari untaian-untaian [glycan yang](#) berdekatan adalah reaksi dua langkah. Langkah pertama melibatkan pembelahan ikatan D-alanyl-D-alanine dari prekursor unit peptida yang bertindak sebagai donor karbonil, pelepasan terminal karboksil D-alanin, dan pembentukan enzim asil. Langkah kedua melibatkan pemecahan zat antara asil-enzim dan pembentukan ikatan peptida baru antara karbonil dari gugus D-alanyl

dan gugus amino unit peptida lain. Sebagian besar diskusi mekanisme DD-peptidase berputar di sekitar katalis transfer proton. Selama pembentukan zat antara enzim asil, proton harus dihilangkan dari gugus hidroksil serin situs aktif dan satu harus ditambahkan ke gugus yang meninggalkan amina. Gerakan proton yang serupa harus difasilitasi dalam deacylation.

2.10 Penambatan Molekul

Setiap senyawa mempunyai sifat elektrostatis dan stereokimia yang spesifik sehingga memiliki interaksi yang berbeda dengan makromolekul. Salah satu jenis interaksi yaitu interaksi antara senyawa obat dengan protein. Jenis interaksi ini dapat ditentukan secara komputasi dengan metode yang dikenal *in silico* (Huang and Zou, 2010).

Uji *in silico* dapat dilakukan dengan cara melakukan *docking* molekul, dimana metode ini akan memprediksi aktivitasnya pada sel target. *Docking* merupakan cara untuk menyamakan antara ligan dari molekul kecil ke dalam sel target dari molekul protein besar (Jensen, 2007). Protein memiliki peran fungsional pada suatu organisme sehingga informasi mengenai kekuatan interaksi ligan dan reseptor mampu memberikan gambaran potensi dan mekanisme aktivitas suatu kandidat senyawa aktif (Ferreira et al, 2015). Pengujian *in silico* dapat menghasilkan nilai *Rerank Score* (RS) atau energi ikatan. Dalam membentuk ikatan antara ligan dan reseptor maka dibutuhkan energi ikatan. Semakin kecil energi ikatan maka semakin stabil ikatan tersebut, sehingga semakin besar pula aktivitasnya (Hardjono, 2012).

Berdasarkan penelitian sebelumnya telah diketahui bahwa *molecular docking* dapat melakukan *skrining* senyawa dan mengkalkulasi ikatan terkuat antara proyein target dan senyawa bioaktif. Terdapat 2 aspek penting dalam *molecular docking*, yaitu fungsi *scoring* dan penggunaan algoritma (Leach, 2017). Fungsi *scoring* dapat memperkirakan afinitas ikatan antara makromolekul dengan ligan (molekul kecil yang mempunyai afinitas terhadap makromolekul). Penggunaan algoritma berfungsi sebagai penentu konformasi (*docking pose*) yang paling stabil dari pembentukan kompleks (Leach, 2017). Sedangkan fungsi *scoring* berperan sebagai penentu jumlah afinitas

ikatan antara makromolekul dengan ligan. Hal ini merupakan cara untuk mengeksplorasi dua molekul seperti kandidat obat dengan suatu enzim target, saling berikatan satu sama lain. Molekul bioaktif atau ligan dapat berikatan pada suatu reseptor tertentu. Interaksi antara kompleks ligan-reseptor ini dapat diidentifikasi oleh program *docking*.

Penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan berbagai komputasi program. Salah satu contohnya adalah program Autodock Vina dan PyRx. Dalam program ini sudah dilengkapi dengan aplikasi lainnya seperti Open Babel dan Autodock Vina. Open Babel berfungsi untuk meminimalisasi energi pada molekul agar mendapatkan struktur 3 dimensi dengan panjang ikatan antar atom yang sesuai. Sedangkan Autodock Vina berfungsi sebagai prediksi konformasi interaksi antara senyawa obat dengan protein, serta memprediksi nilai afinitas interaksi antara mikromolekul dengan makromolekul. (Dallakyan *and* Olson, 2015). Kemudian hasil dari penambatan molekul ini dapat divisualisasikan menggunakan program PyMOL atau Discovery Studio. Pada program ini sudah dilengkapi dengan perhitungan massa molekul dan Muatan elektrostatik pada molekul uji. (Seeliger *and* de Groot, 2010).