

## **BAB 2**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Benalu Batu**

Benalu batu merupakan tanaman yang hidup dan berakar di atas gunung batu yang berada di pegunungan Wawopada Desa Wawopada Kecamatan Lembo Kabupaten Morowali Sulawesi Tengah. Tanaman ini berkhasiat mengobati penyakit kanker/tumor, batuk kering, paru-paru kotor, sakit pinggang, ginjal, maag, dan lain-lain (Novriawan, 2009 dalam Ritna, dkk., 2016).

Tumbuhan Benalu Batu (*Begonia sp.*) merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan secara empiris oleh masyarakat untuk mengobati berbagai penyakit seperti yang ditunjukkan pada gambar 2.1. Tanaman ini digunakan untuk pengobatan tumor dan kanker (Novriawan, 2009 dalam Ritna, dkk., 2016).



**Gambar 2.1** Benalu Batu (*Begonia sp.*)

Ada dua genera keluarga Bitoniaceae. Salah satunya adalah Hillebrandia dan hanya memiliki satu spesies, asli dari Kepulauan Hawaii. Genera lain dikenal sebagai Begonia yang terdiri dari sekitar 1.400 spesies yang tersebar di seluruh dunia (Wendy, dkk., 2003 dalam Chowdhury, 2017).

Tumbuhan keluarga Begoniaceae diklasifikasikan berdasarkan perbedaan dalam struktur daun, akar, dll. Berikut klasifikasi tumbuhan *Begonia sp* (Chowdhury, 2017).

Kingdom : Plantae  
Division : Magnoliophyta  
Class : Magnoliopsida  
Order : Cucurbitales  
Family : Begoniaceae  
Genus : Begonia

## 2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul, atom atau gugus yang memiliki 1 atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluarnya sehingga sangat reaktif dan radikal seperti misalnya radikal bebas turunan oksigen reaktif (Reactive Oxygen Species). Radikal bebas cukup banyak jenisnya tapi yang keberadaannya paling banyak dalam sistem biologis tubuh adalah radikal bebas turunan oksigen atau reactive oxygen species (ROS) dan reactive nitrogen species (RNS). Reactive Oxygen terdiri dari superoksida ( $*O_2$ ), hidroksil ( $*OH$ ), peroksil ( $ROO*$ ), hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), singletoksigen ( $1O_2$ ), oksida nitrit ( $NO*$ ), peroksinitrit ( $ONOO*$ ) dan asam hipoklorit ( $HOCl$ ) (Parwata, 2016).

Kehadiran elektron tidak berpasangan membuat spesies ini tidak stabil, radikal bebas menjadi sangat reaktif terhadap interaksi dengan molekul lain karena mereka perlu memasangkan elektron dan membuat senyawa yang lebih stabil. Meskipun dalam beberapa kasus molekul membutuhkan kondisi ekstrim

untuk membentuk radikal, banyak senyawa sel dapat berubah menjadi radikal dalam kondisi yang relatif lunak, termasuk yang khusus untuk organisme hidup. Pembentukan radikal bebas rumit dan dapat memulai serangkaian reaksi-reaksi tidak terduga yang terjadi dalam tubuh, merusak lipid, albumin dan asam nukleat (Butnariu dan Samfira, 2012).

Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein, serta unsur DNA termasuk karbohidrat. Dari ketiga molekul target tersebut, yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas adalah asam lemak tak jenuh. Berbagai kemungkinan dapat terjadi sebagai akibat kerja radikal bebas. Misal, gangguan fungsi sel, molekul termodifikasi yang tidak dapat dikenali oleh sistem imun, dan bahkan mutasi. Semua bentuk gangguan tersebut dapat memicu munculnya berbagai penyakit (Winarsi, 2007).

### **2.3 Antioksidan**

Antioksidan adalah molekul yang mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh oksidasi molekul lain. Oksidasi adalah reaksi kimia yang mentransfer elektron dari satu molekul ke zat pengoksidasi. Reaksi oksidasi diketahui menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas ini adalah spesies yang sangat reaktif yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan di kulit terluarnya. Begitu mereka terbentuk, reaksi berantai dimulai. Antioksidan bereaksi dengan radikal bebas ini dan melemahkan reaksi berantai ini dengan menghilangkan zat antara radikal bebas dan menghambat reaksi oksidasi lainnya dengan mengoksidasi diri mereka sendiri (Mamta, 2014).

Antioksidan diperlukan untuk mencegah stres oksidatif. Stres oksidatif adalah kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbitalnya, sehingga bersifat sangat reaktif dan mampu mengoksidasi molekul di sekitarnya (lipid, protein, DNA, dan karbohidrat). Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif (Werdhasari, 2014).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen, yaitu enzim-enzim yang bersifat antioksidan, seperti: Superoksida Dismutase (SOD), katalase (Cat), dan glutathione peroksidase (Gpx); serta antioksidan eksogen, yaitu yang didapat dari luar tubuh/makanan. Berbagai bahan alam asli Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktifnya, antara lain vitamin C, E, pro vitamin A, organosulfur,  $\alpha$ -tocopherol, flavonoid, thymoquinone, statin, niasin, phycocyanin, dan lain-lain. Berbagai bahan alam, baik yang sudah lama digunakan sebagai makanan sehari-hari atau baru dikembangkan sebagai suplemen makanan, mengandung berbagai antioksidan tersebut (Werdhasari, 2014).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok, yaitu antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia) dan antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami). Beberapa contoh antioksidan sintetis yang diizinkan penggunaannya secara luas diseluruh dunia untuk digunakan dalam makanan adalah Butylated Hidroxyanisol (BHA),

Butylated Hydroxytoluene (BHT), Tert-Butylated Hydroxyquinon (TBHQ) dan tokoferol (Sayuti dan Yenrina, 2015).

### **2.3.1 Antioksidan Alami**

#### **a. Vitamin A**

Untuk pertumbuhan dan perkembangan tubuh sangat diperlukan vitamin A untuk fungsi sistem imun dan proses penglihatan. beta-karoten mempunyai kemampuan sebagai antioksidan yang dapat berperan penting dalam menstabilkan radikal berinti karbon, sehingga mengurangi resiko terjadinya kanker. Salah satu keunikan sifat antioksidan beta-karoten adalah efektif pada konsentrasi rendah oksigen, sehingga dapat melengkapi sifat antioksidan vitamin E yang efektif pada konsentrasi tinggi oksigen. Beta-karoten juga dapat meningkatkan komunitas antarsel didalam tubuh sehingga dapat meningkatkan daya tahan tubuh. Kandungan beta-karoten pada bahan pangan alami dapat mengurangi resiko terjadinya stroke (Sayuti dan Yenrina, 2015).

#### **b. Vitamin C**

Vitamin C merupakan senyawa yang mudah larut dalam air, , sangat sensitif terhadap kerusakan yang datang dari luar, seperti suhu, gula, garam, pH, oksigen dan katalisator logam. Vitamin C pada buah bisa hilang secara terus menerus selama pengolahan, misalnya selama blansing dan pencucian, pemotongan dan penggilingan. Paparan udara pada jaringan-jaringan akan menyebabkan hilangnya vitamin C akibat oksidasi. Umumnya kehilangan vitamin C terjadi apabila jaringan dirusak dan kontak dengan udara. Selama penyimpanan dalam keadaan beku pun terjadi kehilangan vitamin C. Semakin tinggi suhu

penyimpanan Vitamin C, maka semakin besar terjadinya kerusakan zat gizi (Sayuti dan Yenrina, 2015).

c. Vitamin E

Vitamin E merupakan sebuah senyawa fenolik dan sebagaimana umumnya senyawa fenolik dapat menangkap radikal bebas. Vitamin E merupakan antioksidan larut lemak yang utama dan terdapat dalam membran seluler dimana vitamin ini mereduksi radikal bebas lipid lebih cepat dari pada oksigen. Vitamin E dengan nama kimia tokoferol dikenal sebagai antiosidan yang dipercaya dapat mencegah berbagai macam penyakit seperti kanker, jantung koroner, katarak dan sebagainya dengan cara menjinakkan molekul-molekul radikal bebas yang berbahaya serta menghambat laju proses penuaan. Radikal bebas tergantung pada kualitasnya, merupakan bagian integral dari makanan yang dikonsumsi atau mungkin diproduksi melalui proses oksidatif yang terjadi di dalam tubuh manusia (Sayuti dan Yenrina, 2015).

### **2.3.2 Antioksidan Sintetik**

a. Butil Hidroksi Anisol (BHA)

BHA memiliki kemampuan antioksidan yang baik pada lemak hewan dalam sistem makanan panggang, namun relatif tidak efektif pada minyak tanaman. BHA bersifat larut lemak dan tidak larut air, berbentuk padat putih dan dijual dalam bentuk tablet atau serpih, bersifat volatil sehingga berguna untuk penambahan ke materi pengemas (Sayuti dan Yenrina, 2015).

b. Butil Hidroksi Toluen (BHT)

Antioksidan sintetik BHT memiliki sifat serupa BHA, akan memberi efek sinergis bila dimanfaatkan bersama BHA, berbentuk kristal padat putih dan

digunakan secara luas karena relatif murah. Salah satu antioksidan sintetik yang sering digunakan adalah butil hidroksi toluena (BHT). Menurut Ketaren (1986), senyawa ini tidak beracun tapi menunjukkan aktifitas sebagai antioksidan dengan cara mendeaktivasi senyawa radikal (Sayuti dan Yenrina, 2015).

#### c. Propil Galat

Propil galat mempunyai karakteristik sensitif terhadap panas, dapat membentuk kompleks warna dengan ion metal, sehingga kemampuan antioksidannya rendah. Propil galat memiliki sifat berbentuk kristal padat putih, sedikit tidak larut lemak tetapi larut air, serta memberi efek sinergis dengan BHA dan BHT (Sayuti dan Yenrina, 2015).

#### d. Tert-Butil Hidoksi Quinon (TBHQ)

TBHQ dikenal sebagai antioksidan paling efektif untuk lemak dan minyak, khususnya minyak tanaman. TBHQ memiliki kemampuan antioksidan yang baik pada penggorengan tetapi rendah pada pembakaran. TBHQ dikenal berbentuk bubuk putih sampai coklat terang, mempunyai kelarutan cukup pada lemak dan minyak, tidak membentuk kompleks warna dengan Fe dan Cu tetapi dapat berubah pink dengan adanya basa (Sayuti dan Yenrina, 2015).

## **2.4 Senyawa Metabolit Sekunder**

### **2.4.1 Tanin**

Tanin adalah suatu senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, berasa pahit dan kelat, yang bereaksi dengan dan menggumpalkan protein, atau berbagai senyawa organik lainnya termasuk asam amino dan alkaloid. Menurut Goel, dkk., (2005), tanin adalah senyawa polifenolik larut dalam air yang merupakan anti

nutrisi bagi ruminansia dengan membentuk kompleks dengan protein. Menurut Patra (2010) tanin memiliki berat molekul relatif yang tinggi dan mampu membentuk kompleks dengan protein karena adanya sejumlah gugus hidroksil fenolik. Tanin terdapat pada buah-buahan, legume dan semak, sereal dan biji-bijian (Yuliana, 2014).

#### **2.4.2 Steroid**

Steroid adalah kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 karbon dengan membentuk struktur 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid terdiri atas beberapa kelompok senyawa yang pengelompokannya didasarkan pada efek fisiologis yang dapat ditimbulkan. Ditinjau dari segi struktur, perbedaan antara berbagai kelompok ini ditentukan oleh jenis substituent R1, R2, dan R3 yang terikat pada kerangka dasar sedangkan perbedaan antara senyawa yang satu dengan senyawa yang lain dari satu kelompok ditentukan oleh panjangnya rantai karbon substituent, gugus fungsi yang terdapat pada substituent, jumlah dan posisi gugus fungsi oksigen dan ikatan rangkap pada kerangka dasar serta konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasar (Endarini, 2016).

#### **2.4.3 Flavonoid**

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbesar yang ditemukan di alam. Banyaknya senyawa flavonoid ini bukan disebabkan karena banyaknya variasi struktur, akan tetapi lebih disebabkan oleh berbagai tingkat hidroksilasi, alkoksilasi atau glikoksilasi pada struktur tersebut. Flavonoid di alam juga sering dijumpai dalam bentuk glikosidanya. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu, biru dan sebagian zat warna kuning yang



terdapat dalam tanaman. Sebagai pigmen bunga, flavonoid jelas berperan dalam menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid yang lain bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesis, zat antimikroba, antivirus dan antiinsektisida. Beberapa flavonoid sengaja dihasilkan oleh jaringan tumbuhan sebagai respon terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungsi menyerangnya (Endarini, 2016).

#### **2.4.4 Saponin**

Saponin adalah senyawa glikosida steroid atau triterpenoid yang banyak terdapat pada tanaman. Saponin memiliki kemampuan untuk membentuk senyawa stabil yaitu seperti busa sabun dalam larutan air. Saponin terdiri atas gula yang biasanya mengandung glukosa, galaktosa, asam glukoronat, xylosa, rhamnosa atau methylpentosa yang berikatan membentuk glikosida dengan *hydrophobic aglycone* (sapoogenin) yang membentuk senyawa triterpenoid atau steroid (Francis, dkk., 2002 dalam Yuliana, 2014).

#### **2.4.5 Alkaloid**

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hampir seluruh alkaloid berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan. Ciri khas alkaloid adalah bahwa semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom N yang bersifat basa dan pada umumnya merupakan bagian dari cincin heterosiklik (batasan ini tidak terlalu tepat karena banyak senyawa heterosiklik nitrogen lain yang ditemukan di alam yang bukan tergolong alkaloid) (Endarini, 2016).

## **2.5. Simplisia**

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dikatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan. Eksudat tumbuhan ialah isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau isi sel yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari selnya atau senyawa nabati lainnya yang dengan cara tertentu dipisahkan dari tumbuhannya dan belum berupa senyawa kimia murni. Simplisia nabati sering berasal dan berupa seluruh bagian tumbuhan, tetapi sering berupa bagian atau organ tumbuhan seperti akar, kulit akar, batang, kulit batang, kayu, bagian bunga dan sebagainya. Di samping itu, terdapat eksudat seperti gom, lateks, tragakanta, oleoresin, dan sebagainya (Endarini, 2016).

Proses pemanenan dan preparasi simplisia merupakan proses yang dapat menentukan mutu simplisia dalam berbagai artian, yaitu komposisi senyawa kandungan, kontaminasi, dan stabilitas bahan. Namun demikian, simplisia sebagai produk olahan, variasi senyawa kandungan dapat diperkecil, diatur dan diajapkan. Hal ini karena penerapan iptek pertanian pasca panen yang telah terstandar (Endarini, 2016).

## **2.6 Ekstraksi**

Salah satu metode yang digunakan untuk penemuan obat tradisional adalah metode ekstraksi. Pemilihan metode ekstraksi tergantung pada sifat bahan

dan senyawa yang akan diisolasi. Sebelum memilih suatu metode, target ekstraksi perlu ditentukan terlebih dahulu. Ada beberapa target ekstraksi, diantaranya (Sarker SD, dkk., 2006 dalam Mukhriani, 2014):

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

Semua senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh suatu sumber tetapi tidak dihasilkan oleh sumber lain dengan kontrol yang berbeda, misalnya dua jenis dalam marga yang sama atau jenis yang sama tetapi berada dalam kondisi yang berbeda. Identifikasi seluruh metabolit sekunder yang ada pada suatu organisme untuk studi sidik jari kimiawi dan studi mengenai metabolomik (Mukhriani, 2014).

Proses ekstraksi khususnya untuk bahan yang berasal dari tumbuhan adalah sebagai berikut (Mukhriani, 2014):

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.

Menurut Mukhriani (2014), jenis-jenis metode ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut.

### **2.6.1 Maserasi**

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang memiliki sifat termolabil (Mukhriani 2014).

### **2.6.2 *Ultrasound - Assisted Solvent Extraction***

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi (Mukhriani 2014).

### **2.6.3 Perkolasi**

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Mukhriani 2014).

### **2.6.4 Soxhlet**

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu *reflux*. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Mukhriani 2014).

### **2.6.5 Reflux dan Destilasi Uap**

Pada metode *reflux*, sampel di-masukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu (Mukhriani 2014).

Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari kedua metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Seidel V, 2006 dalam Mukhriani, 2014).

## **2.7 Metode Pengukuran Antioksidan**

### **2.7.1 DPPH (2,2 Diphenyl-1-Picrylhydrazyl)**

Uji DPPH dianggap sebagai metode yang akurat, mudah, dan ekonomis untuk mengevaluasi aktivitas menghambat radikal antioksidan, karena senyawa radikal stabil dan tidak perlu dihasilkan (Kedare dan Singh, 2011). Metode pengujian antioksidan dengan menggunakan DPPH merupakan metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan sampel secara *in vitro* dan sampel yang digunakan hanya sedikit (Jami'ah, dkk., 2018).

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengukur nilai aktivitas hambatan terhadap radikal bebas DPPH menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis melalui dekolorisasi DPPH (Sundu, dkk., 2018). Prinsip dari metode ini adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH, jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang. Untuk mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan digunakan parameter nilai  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration 50%*).  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai konsentrasi senyawa antioksidan

yang dapat menyebabkan hilangnya 50% aktivitas senyawa radikal DPPH (Jami'ah, dkk., 2018; Wahdaningsih, dkk., 2011).

### **2.7.2 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)**

Aktivitas antioksidan total dapat diukur dengan uji daya antioksidan pengurangan ferri (FRAP). Flavonoid dan asam fenolik yang terdapat dalam tanaman obat menunjukkan aktivitas antioksidan kuat dilihat dari potensinya untuk membentuk kompleks dengan atom logam, terutama besi dan tembaga (Vijayalakshmi dan Ruckmani, 2016).

Metode FRAP atau *Ferric Reducing Antioxidant Power* merupakan salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan menggunakan spektrofotometri berdasarkan pada reduksi analog ferroin, kompleks  $\text{Fe}^{3+}$  dari tripiridiltriazin  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{3+}$  menjadi kompleks  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}(\text{TPTZ})^{2+}$  yang berwarna biru intensif oleh antioksidan pada suasana asam. Hasil pengujian diinterpretasikan dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm dan dapat disimpulkan sebagai jumlah  $\text{Fe}^{2+}$  (dalam mikromolekular) ekuivalen dengan antioksidan standar (Yefrida, dkk., 2015).

## **2.8 Spektrofotometer UV-Vis**

Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer merupakan gabungan dari alat optic dan elektrik serta sifat-sifat kimia fisiknya. Spektrofotometer sesuai dengan namanya merupakan alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Ultraviolet jauh memiliki rentang panjang gelombang  $\pm 10\text{--}200$  nm, sedangkan ultraviolet dekat memiliki rentang panjang gelombang  $\pm 200\text{--}400$  nm. Cahaya UV tidak bisa

dilihat oleh manusia, namun beberapa hewan, termasuk burung, reptil dan serangga seperti lebah dapat melihat sinar pada panjang gelombang UV (Suhartati, 2017).



**Gambar 2.2.** Spektrofotometer Uv-Vis

Interaksi senyawa organik dengan sinar ultraviolet dan sinar tampak, dapat digunakan untuk menentukan struktur molekul senyawa organik. Bagian dari molekul yang paling cepat bereaksi dengan sinar tersebut adalah elektron-elektron ikatan dan elektron-elektron nonikatan (elektron bebas). Sinar ultralembayung dan sinar tampak merupakan energi, yang bila mengenai elektron-elektron tersebut, maka elektron akan tereksitasi dari keadaan dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi, eksitasi elektron-elektron ini, direkam dalam bentuk spektrum yang dinyatakan sebagai panjang gelombang dan absorbansi, sesuai dengan jenis elektron-elektron yang terdapat dalam molekul yang dianalisis. Makin mudah elektron-elektron bereksitasi makin besar panjang gelombang yang diabsorpsi, makin banyak elektron yang bereksitasi makin tinggi absorban (Suhartati, 2017).

Pada spektrofotometri UV-Vis ada beberapa istilah yang digunakan terkait dengan molekul, yaitu kromofor, auksokrom, efek batokromik atau pergeseran merah, efek hipokromik atau pergeseran biru, hipsokromik, dan hipokromik.



Kromofor adalah molekul atau bagian molekul yang mengabsorpsi sinar dengan kuat di daerah UV-Vis, misalnya heksana, aseton, asetilen, benzena, karbonil, karbondioksida, karbon monoksida, gas nitrogen. Auksokrom adalah gugus fungsi yang mengandung pasangan elektron bebas berikatan kovalen tunggal, yang terikat pada kromofor yang mengintensifkan absorpsi sinar UV-Vis pada kromofor tersebut, baik panjang gelombang maupun intensitasnya, misalnya gugus hidroksi, amina, halida, alkoksi (Suhartati, 2017).

### **2.8.1 Tipe-tipe Spektrofotometer UV-Vis**

Menurut Suhartati (2017) ada umumnya terdapat dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu *single-beam* dan *double-beam*.

*Single-beam instrument*, dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal. *Single-beam instrument* mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, harganya murah, dan mengurangi biaya yang ada merupakan keuntungan yang nyata. Beberapa instrumen menghasilkan *single-beam instrument* untuk pengukuran sinar ultra violet dan sinar tampak. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800 sampai 1000 nm (Suhartati, 2017).

*Doublebeam* dibuat untuk digunakan pada panjang gelombang 190 sampai 750 nm. *Double-beam instrument* mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati arutan blanko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel Sumber sinar polikromatis, untuk sinar UV adalah lampu deuterium, sedangkan sinar Visibel atau sinar tampak adalah lampu wolfram. Monokromator pada spektrometer UV-Vis digunakan lensa prisma dan filter optik. Sel sampel berupa

kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas dengan lebar yang bervariasi. Detektor berupa detektor foto atau detektor panas atau detektor dioda foto, berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik (Suhartati, 2017).

### **2.8.2 Syarat pengukuran**

Spektrofotometri UV-Visible dapat digunakan untuk penentuan terhadap sampel yang berupa larutan, gas, atau uap. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih Untuk sampel yang berupa larutan perlu diperhatikan beberapa persyaratan pelarut yang dipakai dalam spektrofotometri antara lain (Suhartati, 2017):

1. Harus melarutkan sampel dengan sempurna.
2. Pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (tidak boleh mengabsorpsi sinar yang dipakai oleh sampel)
3. Tidak terjadi interaksi dengan molekul senyawa yang dianalisis.
4. Kemurniannya harus tinggi.

Pelarut yang sering digunakan adalah air, etanol, metanol dan *n*heksana karena pelarut ini transparan pada daerah UV Untuk mendapatkan spektrum UV-Vis yang baik perlu diperhatikan pula konsentrasi sampel (Suhartati, 2017).

## **2.9 Validasi Metode**

Metode yang digunakan di laboratorium kimia analitik harus dievaluasi dan diuji untuk memastikan bahwa metode tersebut mampu menghasilkan data yang valid dan sesuai dengan tujuan, maka metode tersebut harus divalidasi.

Setiap laboratorium direkomendasikan bahwa metode yang baik harus divalidasi ulang atau memverifikasi untuk memastikan bahwa metode tersebut bekerja benar dalam lingkungan lokal. Verifikasi melibatkan lebih sedikit parameter percobaan dibandingkan validasi. Setiap metode baru yang diperkenalkan ke laboratorium juga harus didokumentasikan dan semua analis yang akan menggunakannya harus mendapatkan pelatihan yang memadai dan menunjukkan kompetensi mereka dalam metode sebelum memulai kerja kasus yang sebenarnya. Metode komersial juga perlu revalidation, atau setidaknya verifikasi (Riyanto, 2014).

Beberapa parameter analisis yang harus dipertimbangkan dalam validasi metode analisis diuraikan dan didefinisikan sebagaimana cara penentuannya.

### **2.9.1 Akurasi (Kecermatan)**

Kecermatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Kecermatan dinyatakan sebagai persen perolehan kembali (*recovery*) analit yang ditambahkan. Kecermatan hasil analisis sangat tergantung kepada sebaran galat sistematis di dalam keseluruhan tahapan analisis. Oleh karena itu untuk mencapai kecermatan yang tinggi hanya dapat dilakukan dengan cara mengurangi galat sistematis tersebut seperti menggunakan peralatan yang telah dikalibrasi, menggunakan pereaksi dan pelarut yang baik, pengontrolan suhu, dan pelaksanaannya yang cermat, taat asas sesuai prosedurnya (Harmita, 2004).

Kecermatan ditentukan dengan dua cara yaitu metode simulasi (*spiked-placebo recovery*) atau metode penambahan baku (*standard addition method*). Metode adisi dapat dilakukan dengan menambahkan sejumlah analit dengan

konsentrasi tertentu pada sampel yang diperiksa, lalu dianalisis dengan metode tersebut. Persen perolehan kembali ditentukan dengan menentukan berapa persen analit yang ditambahkan tadi dapat ditemukan (Harmita, 2004).

### 2.9.2 Presisi

Presisi atau *precision* adalah ukuran yang menunjukkan derajat kesesuaian antara hasil uji individual, diukur melalui penyebaran hasil individual dari rata-rata jika prosedur diterapkan secara berulang pada sampel-sampel yang diambil dari campuran yang homogen. Presisi diukur sebagai simpangan baku atau simpangan baku relatif (koefisien variasi). *Precision* dapat dinyatakan sebagai *repeatability* (keterulangan) atau *reproducibility* (ketertiruan) (Riyanto, 2014).

*Repeatability* adalah keseksamaan metode jika dilakukan berulang kali oleh analis yang sama pada kondisi sama dan dalam interval waktu yang pendek. *Repeatability* dinilai melalui pelaksanaan penetapan terpisah lengkap terhadap sampel-sampel identik yang terpisah dari *batch* yang sama, jadi memberikan ukuran keseksamaan pada kondisi yang normal (Riyanto, 2014).

*Reproducibility* adalah keseksamaan metode jika dikerjakan pada kondisi yang berbeda. Biasanya analisis dilakukan dalam laboratorium-laboratorium yang berbeda menggunakan peralatan, pereaksi, pelarut, dan analis yang berbeda pula. Analisis dilakukan terhadap sampel-sampel yang diduga identik yang dicuplik dari *batch* yang sama. *Reproducibility* dapat juga dilakukan dalam laboratorium yang sama dengan menggunakan peralatan, pereaksi, dan analis yang berbeda (Riyanto, 2014).

### 2.9.3 Linearitas

Linearitas adalah kemampuan metode analisis memberikan respon proporsional terhadap konsentrasi analit dalam sampel. Rentang metode adalah pernyataan batas terendah dan tertinggi analit yang sudah ditunjukkan dapat ditetapkan dengan kecermatan, keseksamaan, dan linearitas yang dapat diterima (Riyanto, 2014).

Linearitas biasanya dinyatakan dalam istilah variansi sekitar arah garis regresi yang dihitung berdasarkan persamaan matematik data yang diperoleh dari hasil uji analit dalam sampel dengan berbagai konsentrasi analit. Perlakuan matematik dalam pengujian linearitas adalah melalui persamaan garis lurus dengan metode kuadrat terkecil antara hasil analisis terhadap konsentrasi analit (Riyanto, 2014).

### 2.9.4 LOD dan LOQ

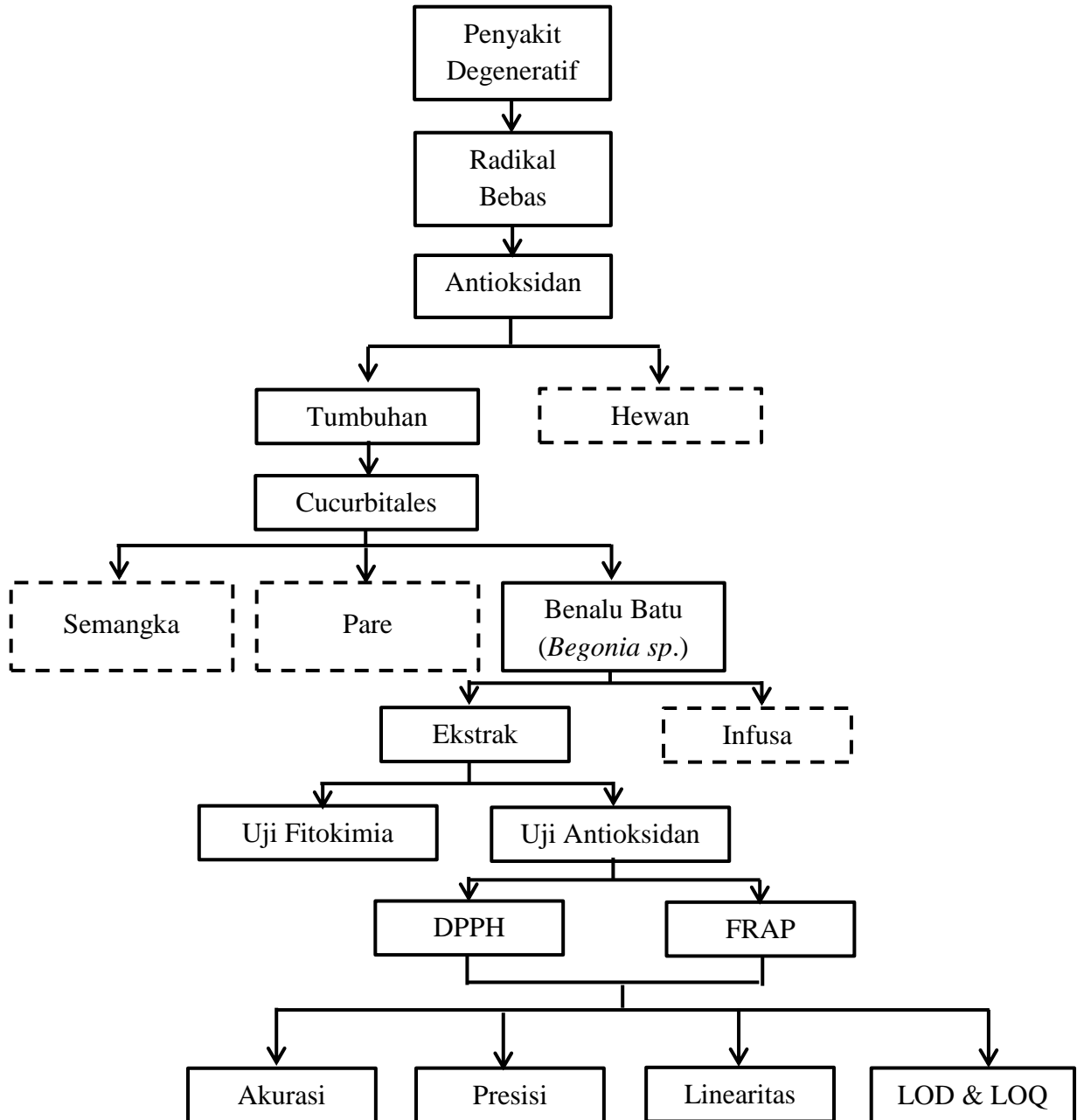
Batas deteksi (*Limit of Detection*) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas deteksi merupakan parameter uji batas. Batas kuantitasi (*Limit of Quantitation*) merupakan parameter pada analisis renik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama (Riyanto, 2014).

Pada spektrofotometer, nilai LOD ini menunjukkan jumlah terkecil analit dalam sampel yang masih dapat terdeteksi oleh spektrofotometer UV-Vis sedangkan nilai LOQ menunjukkan kuantitas terkecil dari analit yang masih dapat memenuhi kriteria cermat dan seksama. Nilai LOD dan LOQ ini dihitung secara statistik melalui garis regresi linier dari kurva kalibrasi. Nilai keduanya

merupakan batas terkecil dari analit yang masih dapat terdeteksi oleh spektrofotometer UV-Vis (Riyanto, 2014).

**BAB 3**  
**KERANGKA KONSEP**

**3.1 Kerangka Konsep**



Keterangan:

: Diteliti

: Tidak Diteliti

**Gambar 3.1.** Skema Kerangka Konsep Penelitian

### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Penyakit degeneratif atau penuaan dapat terjadi akibat radikal bebas atau stress oksidatif (Werdhasari, 2014). Antioksidan mempunyai peranan yang sangat penting bagi kesehatan tubuh manusia karena fungsinya dapat menghambat dan menetralkan terjadinya reaksi oksidasi yang melibatkan radikal-radikal bebas (Parwata, 2016).. Antioksidan eksogen terdiri dari antioksidan alami dan buatan. Antioksidan alami banyak terdapat pada buah-buahan, sayur-sayuran, biji-bijian dan hewani (Silvia, dkk., 2016). Pare, semangka dan benalu batu merupakan tumbuhan yang termasuk dalam ordo Cucurbitales. Benalu Batu (*Begonia sp.*) merupakan tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Benalu ini terdiri dari batang, akar, dan daun. Bagian tumbuhan daun dapat diolah menjadi infusa maupun ekstrak. Dari ekstrak ini, akan diuji fitokimia dan antioksidan. Spektrofotometri terdiri dari metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidants*) (Pisoschi dan Negulescu, 2011). Untuk melihat seberapa baik metode yang digunakan, dilakukan validasi metode meliputi presisi, akurasi, linearitas, LoD dan LoQ metode (Harmita, 2004).