

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*)

2.1.1. Klasifikasi

Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*) tumbuh subur di perairan dangkal Indonesia dengan substrat berpasir atau berbatu. *Sargassum crassifolium* merupakan bagian dari kelompok makroalga coklat (*Phaeophyceae*) yang merupakan genus terbesar dari famili *Sargassaceae* (Novianti, *et al.*, 2021).

Adapun klasifikasi dari *Sargassum crassifolium* sebagai berikut:

Kingdom	:Chromista
Filum	:Heterkontophyta
Class	:Phaeophyceae
Ordo	:Fucales
Family	:Sargassaceae
Genus	: <i>Sargassum</i>
Species	: <i>Sargassum crassifolium</i>

(Angadiredja, *et al.*, 2006)

2.1.2. Morfologi



Gambar 1. Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*)

Sumber: Pribadi

Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*) merupakan rumput laut yang memiliki tubuh (thallus) dengan struktur kompleks, terdiri atas cauloid (batang), filoid (daun), vesikel (gelembung udara), dan holdfast (struktur penempel). Cauloid berbentuk silindris dengan tipe percabangan yang teratur secara bergantian (alternate). Filoid berbentuk oval hingga lonjong dengan pinggiran bergerigi dan ujung yang dapat membulat atau meruncing, serta memiliki midrib (urat tengah) yang jelas dari pangkal hingga ujung. Beberapa filoid juga menunjukkan adanya duplikasi. Vesikel pada *S. crassifolium* berbentuk bulat telur dan berfungsi sebagai alat pengapung untuk menjaga posisi tegak alga di dalam air. Organ reproduksi (*receptacle*) terletak pada percabangan thallus, sering kali bercampur dengan vesikel dan filoid, berbentuk gepeng dengan pinggiran yang rata atau bergelombang (Triastinurmiatiningasih, *et al.*, 2011).

2.1.3. Kandungan Kimia Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*)

Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*) umum ditemukan di perairan tropis, memiliki berbagai kandungan kimia yang bernilai tinggi. Kandungan karbohidrat pada alga ini mencapai 44,33%, terdiri atas fukoidan, laminaran, selulosa, dan alginat (Herliany, *et al.*, 2023). Kadar Alginat yang berkisar antara 5-15%, maka rumput laut ini mempunyai potensi untuk dijadikan sebagai salah satu bahan mentah dalam pembuatan alginat (Handayani, 1999). Alginat yang terdapat dalam alga coklat memiliki aktivitas antioksidan pada tingkat sedang, dengan nilai IC_{50} sebesar 178,377 ppm berdasarkan uji DPPH (*1,1-difenil-2-pikrihidrazil*) (Hidayati *et al.*, 2021). Selain mengandung alginat, alga coklat juga memiliki metabolit sekunder seperti karotenoid dengan nilai IC_{50} sebesar 2,657 mg/mL (Sanger, *et al.*, 2022) serta senyawa fenolik dengan IC_{50} sebesar 62,77 ppm (Sedjati, *et al.*, 2018).

Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*) juga memiliki kandungan Protein, Vitamin C, tanin, iodine, fenol, alginat, asam amino, asam lemak, mineral (Ca, Fe, P) (Pakidi, *et al.*, 2017). Yang dimana kandungan dari Vitamin C dengan kadar sebesar $49,01 \pm 0,75$ mg per 100 gram (Handayani, 1999). Untuk kandungan protein pada thallus *Sargassum crassifolium* yang mencapai sekitar 5,19% dari berat basah (Triastinurmiatiningsih, *et al.*, 2011). Alga Coklat mengandung molekul antioksidan stabil seperti karotenoid, mikosporin-asam amino dan beberapa polifenol seperti phlorotannin (Indu, 2013).

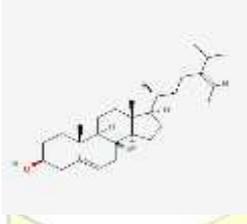
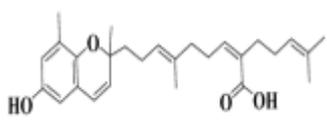
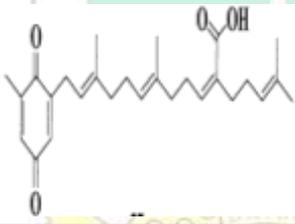
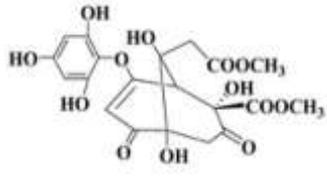
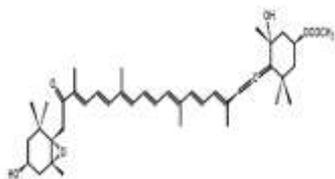
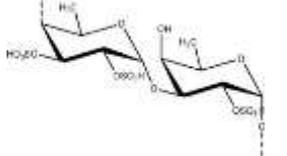
2.1.4. Bioaktivitas Alga Coklat (*Sargassum crassifolium*)

Sargassum crassifolium, salah satu jenis alga cokelat, dikenal memiliki berbagai bioaktivitas seperti aktivitas antifungi, antibakteri, dan antioksidan. Penelitian Maulana (2021) melaporkan bahwa kelompok *Sargassum sp.* memiliki nilai IC_{50} sebesar 823,652 ppm. Dalam uji aktivitas antioksidan, nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan, di mana semakin rendah IC_{50} , semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} yang diperoleh tergolong rendah, namun masih lebih tinggi dibandingkan hasil penelitian dari Pahlawan (2017) pada ekstrak *Sargassum sp.* dari Kepulauan Sumbawa, yang menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 376,98 ppm. Sementara itu, ekstrak etil asetat *Sargassum crassifolium* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 5,246 mg/mL dengan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut meliputi fukoksantin dan karotenoid (Sanger, *et al.*, 2022).

Berdasarkan penelitian oleh Triastinurmiatiningsih, *et al.*, (2015), ekstrak dari alga ini mampu menghambat pertumbuhan jamur, khususnya *Candida albicans*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 75%, ekstrak ini menghasilkan zona hambat terbesar dengan diameter rata-rata 21,6 mm. *Sargassum crassifolium* memiliki potensi besar sebagai agen antibakteri. Aktivitas ini didukung oleh senyawa bioaktif seperti flavonoid dan fenol, yang bekerja melalui mekanisme tertentu. Flavonoid berperan dalam merusak dinding sel bakteri, mengakibatkan gangguan pada struktur dan fungsinya. Di sisi lain, fenol bekerja dengan menghambat proses sintesis protein penting dalam bakteri, yang berujung pada terganggunya metabolisme dan pertumbuhan sel bakteri. Sinergi

dari mekanisme ini menjadikan *Sargassum crassifolium* efektif dalam menekan perkembangan bakteri (Ariyana, *et al.*, 2021)

Tabel 1. Senyawa Bioaktif dari *Sargassum* sp.

Senyawa Bioaktif	Struktur Kimia	Efek Biologis	Sumber
Fucosterol		Antioksidan, antimikroba, antiinflamasi	(Rushdi, <i>et al.</i> , 2020)
Sargachromenol		Antioksidan, antidiabetik, antikoagulan, antitumor	(Rushdi, <i>et al.</i> , 2020)
Asam Sargaquinoic		Antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, antitumor	(Rushdi, <i>et al.</i> , 2020)
Sargassumol		Antioksidan, antidiabetik, antikanker	(Rushdi, <i>et al.</i> , 2020)
Fukoxanthin		Antioksidan, antikanker, antibakteri	(Rushdi, <i>et al.</i> , 2020)
Fukoidan		Antioksidan, antibakteri, antikoagulan	(GV, <i>et al.</i> , 2022)

2.2. Jamur Endofit

2.2.1. Definisi Jamur Endofit

Jamur endofit merupakan jamur yang berkembang di dalam berbagai jaringan tumbuhan tanpa menyebabkan gejala penyakit pada tanaman inangnya (Aly, *et al.*, 2011). Mikroorganisme endofit dapat ditemukan dalam berbagai jaringan tanaman, seperti bunga, buah, batang, daun, akar, dan biji. Mikroorganisme ini berfungsi sebagai pelindung bagi tanaman inang dari tekanan lingkungan dan persaingan dengan mikroorganisme lain (Widowati, *et al.*, 2016).

Jamur endofit hidup dalam bentuk miselium dalam hubungan biologis dengan tanaman hidup setidaknya selama beberapa waktu. Jamur endofit diketahui mampu menghasilkan metabolit sekunder yang bervariasi dalam struktur dan memiliki aktivitas biologis yang signifikan (Gouda, *et al.*, 2016).

2.2.2. Hubungan Jamur Endofit dengan Tumbuhan Inang

Hubungan antara jamur endofit dan tanaman inangnya dapat digambarkan sebagai suatu rangkaian simbiosis yang seimbang, yang meliputi mutualisme, komensalisme, dan parasitisme (Aly, *et al.*, 2011). Interaksi antara mikroba endofit dan tanaman inangnya memberikan keuntungan bagi endofit, seperti pasokan nutrisi dan perlindungan dari tekanan lingkungan yang kurang mendukung, yang mendukung proses reproduksi dan kolonisasi. Sementara itu, tanaman inang juga memperoleh manfaat, seperti peningkatan ketahanan terhadap berbagai tekanan biotik dan abiotik, serta peningkatan pertumbuhannya. Hal ini terjadi melalui produksi fitohormon, peningkatan akses terhadap mineral dan nutrisi, serta sintesis metabolit antagonistik (Akmalasari, *et al.*, 2013).

2.2.3. Metabolit Sekunder dari Jamur Endofit yang Memiliki Aktivitas

Antioksidan

Beberapa contoh isolat jamur endofit yang memiliki aktivitas antioksidan dari berbagai tanaman:

Tabel 2. Isolat Jamur Endofit yang Memiliki Kandungan Antioksidan

Tanaman Inang	Isolat Jamur	Nilai IC ₅₀	Referensi
Daun Kelor (<i>Moringaoleifera</i> <i>L</i>)	<i>Umbelopsis sp.</i> ,	37,48µg/mL	(Yulyanti, <i>et al.</i> , 2023)
Rumput Laut Merah (<i>Eucheuma</i> <i>sp.</i>)	<i>Aspergillus sp</i>	38,64 ppm	(Shintia, <i>et al.</i> , 2017)
Daun Kelor (<i>Moringaoleifera</i> <i>L</i>)	<i>Mortierella sp</i>	49,57 µg/mL)	(Yulyanti, <i>et al.</i> , 2023)
Daun Kelor (<i>Moringaoleifera</i> <i>L</i>)	<i>Fusarium sp.</i>	137,98 µg/mL	(Yulyanti, <i>et al.</i> , 2023)
Buah Mangrove (<i>Agieceras</i> <i>corniculatum</i>)	<i>Microdochium</i> <i>sp</i>	19,28 µg/mL	(Nurhalimah <i>et</i> <i>al.</i> , 2021)
Daun Jambu Air (<i>Syzygium</i> <i>aqueum</i>)	<i>Penicillium sp.</i>	59,16 µg/mL	(Habisukan <i>et al.</i> , 2021)

2.2.4. Identifikasi Jamur Endofit

Identifikasi jamur endofit dapat dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis meliputi karakteristik koloni, seperti warna, bentuk, tekstur permukaan, dan diameter pertumbuhan (Hafsari, *et al.*, 2013). Sementara itu, pengamatan mikroskopis mencakup identifikasi septa pada

hifa, pola pertumbuhan hifa (bercabang atau tidak), serta warna hifa dan konidia (gelap atau transparan). Metode slide culture dapat digunakan untuk identifikasi jamur secara mikroskopis (Wulandari, *et al.*, 2014).

Fungi endofit juga dapat diidentifikasi melalui metode konvensional. Identifikasi konvensional dilakukan dengan menganalisis morfologi dan karakteristik biokimia fungi. Dalam metode molekuler, langkah pertama yang harus dilakukan adalah isolasi DNA, yaitu proses mengekstraksi DNA dari sel dengan tetap menjaga keutuhannya. Keberhasilan isolasi DNA sangat berpengaruh terhadap tahap analisis berikutnya, di mana kualitas DNA yang dihasilkan bergantung pada kondisi sampel tanaman yang digunakan (Linelejan, *et al.*, 2018).

2.3. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul atau bagian molekul yang sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Ketidakstabilan ini membuatnya mudah bereaksi dengan molekul lain di sekitarnya, termasuk lipid membran sel, DNA, dan protein. Reaksi ini dapat mengakibatkan kerusakan struktural dan fungsional pada molekul-molekul penting tersebut, yang pada akhirnya memicu perkembangan berbagai penyakit degeneratif, seperti kanker, diabetes, penyakit kardiovaskular, dan gangguan neurodegeneratif (Kubandari, *et al.*, 2016).

Radikal bebas dapat terbentuk dalam tubuh sebagai hasil sampingan dari berbagai proses biologis, seperti oksidasi dan pembakaran sel yang terjadi saat

bernapas, metabolisme sel, serta aktivitas fisik atau olahraga yang dilakukan secara berlebihan. Selain itu, radikal bebas juga dapat dihasilkan selama peradangan dalam tubuh. Paparan faktor eksternal seperti polusi udara, termasuk asap kendaraan dan rokok, konsumsi makanan tertentu, paparan logam berat, polusi industri, dan radiasi matahari juga berperan dalam pembentukan radikal bebas (Maharani, *et al.*, 2021).

2.4. Antioksidan

2.4.1. Definisi Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang berperan dalam menetralkan dan menonaktifkan radikal bebas serta spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat merusak sel dan jaringan tubuh (Halliwell, *et al.*, 2007). Radikal bebas ini dihasilkan dari berbagai proses metabolisme oksidatif di dalam tubuh, seperti reaksi kimia yang terjadi saat sel menghasilkan energi. Selain itu, aktivitas ini juga dapat dipicu oleh faktor luar seperti polusi atau radiasi (Kubandari, *et al.*, 2017).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dapat dibagi menjadi dua jenis, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan alami adalah senyawa yang secara alami terdapat dalam tubuh manusia dan berperan sebagai mekanisme pertahanan tubuh, seperti *Superoxide Dismutase*, *Glutathione Peroxidase*, dan *Catalase*. Selain itu, antioksidan alami juga dapat diperoleh dari luar tubuh melalui makanan atau suplemen, seperti **alfa-tokoferol (vitamin E)**, **asam askorbat (vitamin C)**, *glutathion*, dan *ubiquinon*. Sementara itu, antioksidan sintetis adalah senyawa yang dihasilkan melalui proses sintesis kimia. Contohnya

meliputi *Butyl Hidroksil Anitol (BHA)*, *Butyl Hidroksi Toluene (BHT)*, *Tert-Butil Hidroksi Buinon (TBHQ)*, dan *Propil Galat* (Kamoda, *et al.*, 2021).

2.4.2. Mekanisme Kerja Antioksidan

Senyawa antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan atom hidrogen atau proton kepada senyawa radikal, sehingga membantu melengkapi kekurangan elektron yang dibutuhkan oleh radikal bebas. Dengan cara ini, antioksidan dapat menghentikan reaksi berantai dalam pembentukan radikal bebas, yang jika tidak dikendalikan dapat merusak sel dan jaringan tubuh. Proses ini membuat senyawa radikal menjadi lebih stabil, sehingga dapat mengurangi dampak negatif yang ditimbulkan oleh stres oksidatif dalam tubuh (Poli, *et al.*, 2022).

Berdasarkan fungsinya, antioksidan terbagi menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer berperan sebagai pemutus rantai dengan mendonorkan hidrogen atau elektron kepada radikal bebas, sehingga menstabilkannya. Mekanisme ini membantu menunda tahap inisiasi dan menghambat proses otooksidasi pada tahap propagasi. Selain itu, antioksidan primer juga mencegah pembentukan radikal bebas baru dengan bertindak sebagai pemberi atom hidrogen, yang dapat dengan cepat bereaksi dengan radikal lipida dan mengubahnya menjadi bentuk yang lebih stabil. Sementara itu, antioksidan sekunder memperlambat laju autooksidasi lipid melalui berbagai mekanisme, seperti mengikat ion logam, menangkap oksigen, serta menguraikan hidroperoksida menjadi senyawa nonradikal. Antioksidan sekunder juga memperlambat proses autooksidasi dengan menghentikan reaksi berantai, sehingga mencegah kerusakan lebih lanjut. Contoh antioksidan sekunder antara

lain vitamin E, vitamin C, dan beta-karoten, yang dapat diperoleh dari buah-buahan (Yunanto, *et al.*, 2009).

2.4.3. Antioksidan Pemanding

2.4.3.1. Vitamin C

Vitamin C adalah vitamin yang larut dalam air yang memiliki peran esensial dalam berbagai proses metabolisme tubuh. Fungsi utamanya adalah sebagai koenzim atau kofaktor yang membantu berbagai reaksi biokimia penting. Vitamin ini juga dikenal dengan nama asam askorbat karena sifatnya yang kuat sebagai agen reduksi. Sebagai agen reduksi, vitamin C berperan dalam melawan oksidasi dengan cara menyumbangkan elektronnya, sehingga melindungi molekul lain dari kerusakan oksidatif. Selain itu, vitamin C sangat penting dalam reaksi hidroksilasi, yakni proses penambahan gugus hidroksil (-OH) pada molekul tertentu, yang menjadi kunci dalam sintesis kolagen dan pembentukan jaringan ikat, serta pemeliharaan berbagai struktur tubuh (Winarno, 1995).

Vitamin C stabil dalam kondisi asam, tetapi mudah rusak jika terkena oksidasi, lingkungan alkali, panas, atau kontak dengan logam seperti besi dan tembaga. Dalam tubuh, fungsi utama vitamin C adalah sebagai antioksidan yang melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Radikal bebas yang sangat reaktif dapat merusak struktur dan fungsi sel, tetapi efek ini dapat diminimalkan oleh vitamin C yang mendukung sistem kekebalan tubuh dan menghambat reaksi oksidasi. Selain perannya pada manusia, asam askorbat juga memiliki manfaat penting bagi tanaman (Winarsi, 2007).

2.4.3.2. *Butylated hydroxytoluene (BHT)*

Butylated Hydroxytoluene (BHT) adalah antioksidan sintetis yang banyak digunakan dalam industri makanan, kosmetik, dan farmasi untuk mencegah oksidasi lemak dan memperpanjang umur simpan produk. Sebagai antioksidan fenolik, BHT bekerja dengan menetralkan radikal bebas melalui mekanisme transfer atom hidrogen, sehingga menghambat reaksi berantai oksidatif yang dapat merusak kualitas produk. Dalam berbagai studi, BHT sering digunakan sebagai standar pembanding dalam uji aktivitas antioksidan, seperti metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dan ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*), karena kestabilannya dan efektivitasnya dalam menangkap radikal bebas. (Yehye, et al., 2015).

Namun, efektivitas BHT dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, seperti pH dan keberadaan ion logam. Studi menunjukkan bahwa pada pH rendah (di bawah 2,5), aktivitas antioksidan BHT menurun, sedangkan pada pH lebih tinggi, aktivitasnya meningkat, menunjukkan bahwa kondisi lingkungan dapat mempengaruhi kinerja BHT dalam sistem tertentu. Selain itu, meskipun BHT efektif sebagai antioksidan, beberapa penelitian mengindikasikan potensi efek toksik pada tingkat seluler, seperti induksi kematian sel non-apoptotik pada limfosit tikus, yang berbeda dengan efek BHA yang cenderung menyebabkan apoptosis. Oleh karena itu, meskipun BHT berguna sebagai antioksidan dan standar dalam uji aktivitas antioksidan, penting untuk mempertimbangkan faktor-faktor lingkungan dan potensi efek sampingnya dalam aplikasi praktis (Dawidowicz, AL, et al., 2011)

2.6. Ekstraksi

2.6.1. Definisi Ekstraksi

Ekstraksi merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut sebagai pemisah (Aprillah,2016). Berbagai teknik ekstraksi memiliki kelebihan dan kekurangannya masing-masing, sehingga pemilihan metode yang tepat harus mempertimbangkan beberapa faktor, seperti sifat senyawa yang akan diekstraksi, pelarut yang digunakan, dan alat yang tersedia. Selain itu, faktor-faktor seperti struktur senyawa, suhu, dan tekanan juga sangat penting dalam proses ekstraksi (Hanan, 2015).

Dalam ekstraksi, terdapat beberapa istilah yang umum digunakan, seperti ekstrak (pelarut yang digunakan untuk ekstraksi), rafinat (larutan yang mengandung senyawa yang akan diekstraksi), dan linarut (senyawa yang diinginkan terlarut dalam rafinat). Pemilihan metode ekstraksi yang sesuai sangat bergantung pada jenis, sifat fisik, dan sifat kimia dari senyawa yang akan diekstraksi. Tujuan ekstraksi adalah untuk memisahkan atau menarik senyawa dari campuran atau simplisia. Berbagai metode ekstraksi telah dikenal, masing-masing dengan kelebihan dan kekurangannya. Beberapa teknik ekstraksi yang umum digunakan meliputi maserasi, perlokasi, refluks, soxhletasi, infusa, dekok, distilasi, ekstraksi lawan arah (*countercurrent*), ultrasonik, ekstraksi gelombang mikro (*microwave assisted extraction, MAE*), serta ekstraksi gas superkritikal (*supercritical gas extraction, SGE*) (Hujjatusnaini, *et al.*, 2021).

2.6.2. Metode Ekstraksi

a. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi yang sederhana dan paling sering digunakan, baik untuk skala kecil maupun industri (Agoes, 2007). Proses ini dilakukan dengan mencampurkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah tertutup rapat pada suhu kamar. Ekstraksi dihentikan saat konsentrasi senyawa dalam pelarut mencapai kesetimbangan dengan konsentrasi senyawa dalam sel tanaman. Setelah itu, pelarut dipisahkan dari sampel melalui penyaringan. Meskipun metode ini efektif, maserasi memiliki beberapa kekurangan, seperti waktu yang lama, penggunaan pelarut yang cukup banyak, serta kemungkinan hilangnya beberapa senyawa. Selain itu, beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun, keunggulan dari maserasi adalah kemampuannya untuk mencegah kerusakan senyawa yang sensitif terhadap panas (Muhkriani, 2014)

b. Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi di mana simplisia yang telah dihancurkan diekstraksi dengan pelarut yang sesuai dengan cara dialirkan perlahan-lahan melalui sebuah kolom (Febriana, *et al.*, 2019). Dalam metode ini, serbuk sampel dibasahi perlahan dalam perkolator, yaitu wadah silinder yang dilengkapi dengan kran di bagian bawah. Pelarut ditambahkan di bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan ke bagian bawah. Keuntungan dari metode ini adalah sampel terus-menerus teraliri pelarut baru. Namun, kelemahannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen, pelarut akan sulit mencapai seluruh

bagian. Selain itu, metode perkolasi memerlukan banyak pelarut dan waktu yang cukup lama untuk proses ekstraksi (Mukhriani, 2014).

c. Soxhletasi

Metode Soxhlet adalah teknik ekstraksi yang menggunakan pelarut baru secara kontinu, umumnya dilakukan dengan alat khusus yang memungkinkan proses ekstraksi berlangsung konstan, berkat adanya pendingin balik (Hanan, 2015). Dalam metode ini, serbuk sampel dimasukkan ke dalam sarung selulosa (atau kertas saring) yang diletakkan di dalam klonsong. Klonsong ini kemudian ditempatkan di atas labu yang berisi pelarut, dan di bawah kondensor yang berfungsi untuk mendinginkan uap pelarut yang naik. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan dipanaskan dalam suhu yang diatur di bawah titik didih pelarut (suhu reflux). Proses ini memungkinkan pelarut untuk menguap, naik ke kondensor, dan kemudian kembali ke labu dalam bentuk cairan, sehingga memastikan ekstraksi yang kontinu dan efisien (Mukhriani, 2014).

d. Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi yang dilakukan pada suhu titik didih pelarut, selama durasi tertentu, dengan jumlah pelarut yang relatif tetap dan dilengkapi dengan pendingin balik untuk memastikan hasil ekstraksi lebih optimal atau lengkap. Proses refluks biasanya diulang beberapa kali (sekitar 3-6 kali) terhadap residu yang tersisa dari ekstraksi sebelumnya. Teknik ini juga memungkinkan penguraian senyawa yang sensitif terhadap panas untuk diminimalkan. Prinsip kerja metode refluks adalah menggunakan pelarut volatil

yang menguap pada suhu tinggi. Uap pelarut tersebut kemudian didinginkan oleh kondensor sehingga berubah menjadi cairan kembali dan turun ke wadah reaksi. Dengan cara ini, pelarut tetap tersedia dalam sistem selama proses reaksi berlangsung (Azhari, *et al.*, 2020).

e. Destilasi

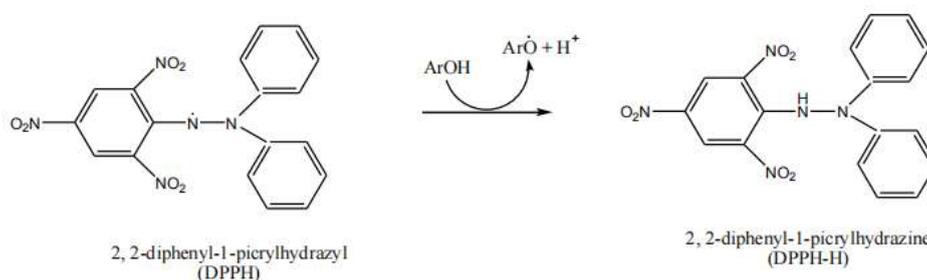
Destilasi adalah metode pemisahan analit dari komponen lain berdasarkan perbedaan titik didih. Metode ini dapat dibedakan menjadi tiga jenis utama: destilasi air, destilasi uap, dan destilasi uap-air (Gandjar *et al.*, 2007). Prinsip dasar destilasi adalah memisahkan komponen berdasarkan titik didihnya. Proses ini dilakukan dengan merendam bahan yang akan disuling dalam air, kemudian memanaskannya hingga mendidih. Uap yang dihasilkan dialirkan melalui kondensor (alat pendingin), di mana uap tersebut terkondensasi kembali menjadi cairan. Cairan hasil kondensasi, yang merupakan campuran air dan minyak, ditampung dalam wadah. Setelah dibiarkan beberapa saat, campuran ini akan terpisah menjadi dua lapisan, tergantung pada berat jenis masing-masing komponen. Komponen dengan berat jenis lebih besar akan berada di bagian bawah. Pemisahan antara minyak dan air dilakukan dengan membuka keran pada wadah penampung (Taufiq, *et al.*, 2008).

2.7. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Beberapa metode yang umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada tumbuhan didasarkan pada mekanisme kerjanya, yaitu transfer hidrogen atau transfer elektron, antara lain :

2.7.1. Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Metode DPPH merupakan salah satu cara untuk mengukur aktivitas antioksidan dari suatu senyawa atau bahan alami. Prinsip dasar metode ini adalah interaksi antara atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa antioksidan dengan elektron bebas pada senyawa radikal. Interaksi ini menghasilkan perubahan bentuk dari senyawa radikal bebas, yaitu diphenylpicrylhydrazyl, menjadi senyawa non-radikal yang dikenal sebagai diphenylpicrylhydrazine. Proses ini ditandai dengan perubahan warna larutan, dari ungu (ketika senyawa berada dalam kondisi radikal bebas) menjadi kuning (saat senyawa radikal telah mengalami reduksi oleh antioksidan) (Molyneux, *et al.*, 2004).



Gambar 2. Mekanisme reaksi DPPH (*2,2-difenil-1- pikrilhidrazil*)

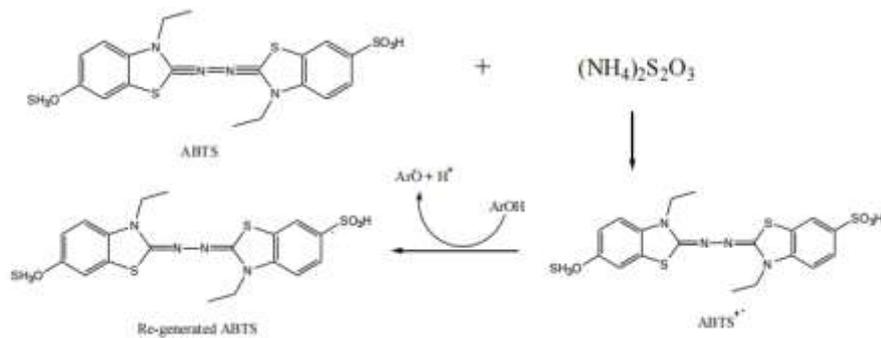
Dalam pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, parameter yang digunakan adalah IC_{50} . IC_{50} mengacu pada konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menangkap 50% radikal DPPH yang tersedia. Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan kekuatan aktivitas antioksidan: semakin kecil nilai IC_{50} , semakin kuat kemampuan antioksidan dalam menangkap radikal bebas. Dengan demikian, IC_{50} menjadi indikator penting dalam menentukan efektivitas antioksidan suatu senyawa (Setiawan, *et al.*, 2018).

2.7.2. Metode ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

Metode ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) merupakan metode yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan serta konsentrasi radikal bebas dalam suatu sampel (Faisal, *et al.*, 2019). Pada metode ini, ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) bertindak sebagai radikal bebas yang kehilangan kation, sehingga memungkinkan terjadinya reaksi dengan senyawa antioksidan. Reaksi tersebut terjadi ketika senyawa antioksidan mendonorkan proton atau elektron kepada radikal bebas, yang pada akhirnya menghambat reaksi oksidasi atau menangkap radikal bebas tersebut (Kurniasari, *et al.*, 2022).

Prinsip utama dari metode ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) adalah interaksi antara senyawa antioksidan dengan radikal ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*). Senyawa antioksidan akan mendonorkan elektronnya kepada radikal ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*), yang menyebabkan terjadinya perubahan warna larutan. Warna larutan yang semula biru-hijau akan memudar hingga menjadi tidak berwarna, tergantung pada kapasitas antioksidan dalam sampel. Semakin besar peredaman warna, semakin tinggi aktivitas antioksidan yang ditunjukkan oleh sampel (Kurniasari, *et al.*, 2022). Metode ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) memiliki keunggulan fleksibilitas dalam penggunaan, karena radikal ABTS (*2,2-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*) dapat larut baik dalam pelarut organik maupun air. Hal ini memungkinkan

pengujian dilakukan pada senyawa antioksidan dengan sifat lipofilik maupun hidrofilik (Kurniasari, *et al.*, 2022).



Gambar 3. Mekanisme reaksi ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat))

2.7.3 Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) bekerja berdasarkan prinsip reduksi analog ferroin. Dalam metode ini, ion Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripirydidyl-s-triazine) direduksi menjadi Fe^{2+} -TPTZ melalui transfer elektron yang diberikan oleh senyawa antioksidan (Naji, *et al.*, 2020). Aktivitas antioksidan diukur dengan mengamati kemampuan senyawa untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Semakin banyak ion Fe^{3+} yang direduksi oleh senyawa, semakin besar aktivitas antioksidan yang dimiliki. Perubahan ini ditandai oleh perubahan warna larutan dari tidak berwarna menjadi biru (Kurniasari, *et al.*, 2022).

Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) memiliki beberapa kelebihan, di antaranya adalah biaya yang relatif murah, reagen yang mudah disiapkan, serta prosedur yang sederhana dan cepat. Namun, metode ini memiliki

keterbatasan karena tidak memberikan respons yang cepat terhadap beberapa jenis antioksidan, seperti glutathione (Maryam, *et al.*, 2016)

2.7.4. Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Prinsip metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) didasarkan pada reaksi reduksi-oksidasi sederhana antara ion Cu^{2+} (cupric) sebagai akseptor elektron dan senyawa antioksidan sebagai donor elektron. Ion Cu^{2+} direduksi menjadi ion Cu^+ (cuprous) oleh senyawa antioksidan. Reaksi ini menggunakan pereaksi Cu(II)-neocuproin ($\text{Cu}^{2+}-(\text{Nc})_2$) sebagai agen pengkkelat atau oksidator, di mana kompleks ini mampu berinteraksi secara spesifik dengan senyawa antioksidan. Keberadaan aktivitas antioksidan ditandai dengan perubahan warna larutan dari tidak berwarna menjadi kuning kecokelatan. Intensitas warna hasil reaksi ini dapat diukur secara kuantitatif pada panjang gelombang 450 nm menggunakan spektrofotometer (Maryam, *et al.*, 2016).

Metode CUPRAC memiliki banyak keunggulan. Pereaksinya bersifat selektif karena memiliki nilai potensial reduksi yang rendah, sehingga memungkinkan identifikasi senyawa antioksidan yang relevan secara fisiologis. Pereaksi ini juga stabil, dapat disiapkan dengan mudah, dan memiliki waktu reaksi yang cepat. CUPRAC dapat digunakan untuk senyawa antioksidan dengan sifat hidrofilik maupun lipofilik, sehingga fleksibel untuk berbagai jenis sampel, termasuk dalam pH fisiologis. Dibandingkan metode lain seperti DPPH atau ABTS, CUPRAC menawarkan akurasi yang tinggi dan lebih serbaguna dalam pengukuran aktivitas antioksidan. Kelebihan lainnya adalah metode ini mudah diterapkan di laboratorium dengan peralatan standar, membutuhkan biaya yang

relatif rendah, dan menghasilkan data yang terpercaya serta dapat direproduksi. Kombinasi dari kemudahan, kecepatan, serta fleksibilitas menjadikan metode CUPRAC pilihan yang efisien untuk penelitian aktivitas antioksidan, baik dalam bahan alami maupun senyawa sintetis (Aryanti, *et al.*, 2021).

2.7.5. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) mengukur kemampuan senyawa antioksidan dalam meredam radikal peroksil dengan cara mendonorkan atom hidrogen. Prinsip dasar metode ini adalah penurunan intensitas fluoresen selama waktu reaksi, yang mencerminkan kemampuan antioksidan untuk mengatasi radikal bebas. Mekanisme kerjanya melibatkan penggunaan inisiator AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride), yang menghasilkan radikal peroksil melalui oksidasi. Radikal peroksil ini kemudian bereaksi dengan molekul fluoresen, seperti fluorescein atau β -pikoeritrin, yang mengakibatkan hilangnya fluoresensi. Penurunan intensitas fluoresen ini diukur pada panjang gelombang emisi 520 nm dan eksitasi 480 nm, dan proses ini dicatat selama 30 menit setelah penambahan AAPH, yang memungkinkan pengukuran aktivitas antioksidan dalam menetralkan radikal bebas (Ácsová, *et al.*, 2020).

Kelebihan metode ORAC adalah prosesnya yang cepat, biaya rendah, dan dapat digunakan untuk mengukur antioksidan yang bersifat hidrofilik maupun hidrofobik, serta relevansinya secara fisiologis. Namun, metode ini juga memiliki kekurangan, yaitu sulit dalam pelaksanaannya karena memerlukan ketelitian

tinggi, dan sensitif terhadap suhu rendah yang dapat mempengaruhi reproduktifitas hasil pengujian. (Aryanti, *et al.*, 2021).

2.8. Kromatografi Lapis Tipis

Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik analisis sederhana yang digunakan untuk mendeteksi dan memisahkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Keberhasilan pemisahan senyawa dalam KLT sangat bergantung pada perbandingan komposisi eluen, yang memainkan peran penting dalam proses pemisahan. Eluen, atau pelarut fase gerak, adalah cairan yang digunakan untuk menggerakkan fase diam pada plat KLT dan membawa senyawa-senyawa dalam sampel sehingga terjadi pemisahan. Oleh karena itu, optimasi komposisi eluen merupakan langkah krusial untuk memastikan bahwa pemisahan senyawa berlangsung dengan optimal. Perbandingan eluen, yang juga dikenal sebagai rasio campuran pelarut, merujuk pada proporsi relatif berbagai komponen pelarut dalam eluen yang digunakan selama proses kromatografi. Pengaruh perbandingan eluen ini sangat signifikan dalam mempengaruhi hasil pemisahan dan analisis senyawa dalam sampel. Komposisi eluen yang tepat dapat menentukan keberhasilan pemisahan dalam KLT, sehingga optimasi eluen menjadi faktor penting untuk mencapai hasil yang akurat dan efektif (Lintang, *et al.*, 2024).

Pada Kromatografi Lapis Tipis (KLT), identifikasi awal suatu senyawa dilakukan dengan membandingkan nilai R_f (*retardation factor*) sampel dengan nilai R_f standar. Namun, nilai R_f dapat bervariasi, baik antara laboratorium yang berbeda maupun dalam satu laboratorium pada waktu yang berbeda. Hal ini

disebabkan oleh berbagai faktor yang mempengaruhi proses kromatografi. Oleh karena itu, untuk mengatasi variasi ini, sering digunakan Rf relatif, yaitu membandingkan nilai Rf dari noda senyawa dengan noda senyawa lain yang ada pada plat yang sama. Faktor-faktor yang dapat menyebabkan variasi nilai Rf antara lain adalah dimensi dan jenis ruang, sifat serta ukuran lempeng KLT, arah aliran fase gerak, volume dan komposisi fase gerak, kondisi kesetimbangan, kelembaban, serta metode persiapan sampel yang digunakan sebelumnya. Oleh karena itu, pemahaman dan kontrol terhadap faktor-faktor ini sangat penting untuk memastikan hasil yang akurat dalam analisis KLT (Wulandari, L., 2011).

Prinsip dasar metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah "*like dissolves like*" yang mengacu pada kecenderungan senyawa polar larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non-polar larut dalam pelarut non-polar. Pemisahan senyawa dalam KLT ditentukan oleh interaksi senyawa dengan fase diam dan fase gerak. Senyawa polar biasanya memiliki afinitas lebih besar terhadap fase diam (yang bersifat polar), sehingga pergerakannya di lempeng menjadi lebih lambat. Sebaliknya, senyawa non-polar lebih mudah larut dalam fase gerak (yang bersifat non-polar) dan bergerak lebih cepat. Prinsip ini memungkinkan pemisahan komponen dalam campuran berdasarkan perbedaan polaritasnya, mempermudah proses analisis (Wulandari, L., 2011).

2.9. Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan tahap dalam identifikasi kandungan senyawa tertentu atau metabolit sekunder dalam bahan alam yang akan diteliti. Keberhasilan proses ini sangat dipengaruhi oleh pemilihan pelarut dan metode

ekstraksi, karena pelarut yang tidak sesuai dapat menghambat penarikan senyawa aktif secara optimal (Kristanti, 2019). Secara umum, uji fitokimia meliputi identifikasi senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid/steroid, saponin, dan tanin. Pengujian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan senyawa tertentu yang dapat dikaitkan dengan aktivitas biologi tumbuhan, sehingga mendukung penelitian dalam bidang fitofarmakologi. Prinsip pemeriksaan fitokimia melibatkan penggunaan reagen pendeteksi untuk mengidentifikasi golongan senyawa kimia seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, dan terpenoid. Pemilihan pelarut dan metode ekstraksi yang tepat sangat penting untuk memastikan hasil yang optimal. Uji fitokimia harus memenuhi persyaratan sederhana, cepat, dan dapat dilakukan dengan peralatan minimal (Aliwu, *et al.*, 2020).

Secara kualitatif, uji fitokimia dilakukan melalui reaksi uji warna menggunakan pereaksi tertentu. Berbagai reagen digunakan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak. Alkaloid dapat dideteksi menggunakan reagen *Dragendorff*, *Wagner*, dan *Mayer*, masing-masing menunjukkan hasil positif berupa endapan merah atau oranye, coklat, dan putih. Untuk mendeteksi senyawa fenolik dan tanin, larutan FeCl_3 (besi(III) klorida) digunakan, dengan perubahan warna menjadi hijau, biru, atau hitam sebagai indikator keberadaannya. Asam sulfat (H_2SO_4) sering digunakan dalam uji flavonoid dan steroid, dengan perubahan warna tertentu sebagai tanda positif. Selain itu, pereaksi *Liebermann-Burchard*, yang terdiri dari asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat, digunakan untuk mengidentifikasi steroid dan terpenoid berdasarkan perubahan warna yang khas. Uji flavonoid dapat dilakukan dengan

pereaksi magnesium (Mg) dan HCl, yang menghasilkan warna jingga atau merah muda jika flavonoid ada, atau dengan larutan NaOH (sodium hidroksida), yang menunjukkan warna kuning atau merah sebagai tanda positif. Setiap reagen memberikan hasil visual yang spesifik sesuai dengan jenis senyawa yang diuji (Masriany,*etal.*,2020)



