

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Sawo

2.1.1 Morfologi Tanaman Sawo

Manilkara Zapota atau sering disebut sawo manila tumbuh sebagai pohon berukuran sedang hingga besar dengan tinggi hingga 20 m dan diameter batang hingga 1 m. Daunnya berukuran 10-30 mm tersusun berselang-seling dan bergerombol di ujung cabang. Daunnya berbentuk lanset hingga lonjong dengan ujung daun lancip dan seluruh tepi daun. Daun muda dan ujung cabang ditutupi dengan rambut halus berwarna coklat kemerahan. Semua bagian tanaman menghasilkan getah susu. Bunga aktinomorfik yang lengkap dan sempurna tersusun dalam kelompok di ketiak daun. Struktur bunga ditutupi rambut berwarna coklat kemerahan. Kelopak memiliki 6 sepal yang tidak menyatu. Mahkota bunga memiliki 6 kelopak putih yang menyatu menjadi cangkir dangkal. Ada 6 benang sari yang menyatu di tepi mahkota bunga serta banyak staminodia (pelengkap seperti benang sari yang tidak berfungsi). Ovarium setengah inferior dengan 6 lokula dan banyak biji. Buahnya adalah buah beri yang berwarna coklat muda dan bersisik saat matang. (Alves Araújo A, 2020)

2.1.2 Klasifikasi Tanaman Sawo

Sawo *M. zapota* adalah tanaman buah yang termasuk dalam famili *Sapotaceae* yang berasal dari Amerika Tengah dan Meksiko. Tanaman sawo merupakan tumbuhan tropis yang mudah beradaptasi sehingga banyak dibudidayakan di berbagai negara dan di Indonesia, sawo banyak ditanam di lahan pekarangan dan sangat mudah dijumpai di pasaran.

Tanaman sawo *Manilkara zapota* merupakan salah satu tanaman buah yang populer di Indonesia. Buah sawo memiliki rasa manis dan tekstur yang lembut, sehingga banyak digemari masyarakat. Selain rasanya yang lezat, buah sawo juga memiliki banyak manfaat kesehatan. Salah satu manfaatnya adalah sebagai sumber antioksidan seperti flavonoid, tanin, dan saponin.

Penelitian tentang aktivitas antioksidan tanaman sawo masih terus dilakukan. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi yang bermanfaat bagi masyarakat tentang potensi tanaman sawo sebagai sumber antioksidan alami.

Berikut klasifikasi tanaman sawo:

Kerajaan : *Plantae*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Bangsa : *Ebenales*

Suku : *Sapotaceae*

Marga : *Manilkara*



Gambar 1. Tanaman Sawo (*M. zapota* L.) (Mehnaz B & Bilal A, 2017)

2.1.3 Kandungan Kimia Tanaman Sawo

Penelitian yang dipublikasikan oleh (Ma, *et al.*, 2003), melaporkan melalui uji ABTS bahwa buah sawo memiliki kapasitas antioksidan setara asam askorbat (AEAC) sebesar $3.396 \pm 387,9$ mg/kg. Dari 10 senyawa antioksidan yang diisolasi dari ekstrak buah metanol, metil-4- *O* -galloylchlorogenate menunjukkan kapasitas antioksidan tertinggi dalam uji DPPH, $IC_{50} = 12,9$ μ M; diikuti oleh asam 4- *O* -galloylchlorogenic, $IC_{50} = 23,5$ μ M (Lim, TK., 2013). (Islam *et al.*, 2021), menguji aktivitas antioksidan dari dosis 100 μ g/ml daun etanol melalui uji FRAP dan kapasitas antioksidan pereduksi tembaga (CUPRAC). Hasil menunjukkan potensi reduksi yang kuat dengan AEAC masing-masing $53,3 \pm 2,85$ dan $40,09 \pm 3,61$ μ M, yang menunjukkan kapasitas donor elektron yang signifikan. Ekstrak kulit etanol juga menunjukkan kapasitas antioksidan dalam uji DPPH dengan $IC_{50} = 16,83$ μ g/ml, dibandingkan dengan asam askorbat $IC_{50} = 4,87$ μ g/ml (Islama, *et al.*, 2010).

Ekstrak air dan metanol dengan struktur sawo yang berbeda dievaluasi untuk menentukan aktivitas antioksidannya. Ekstrak metanol kasar bunga menunjukkan DPPH dan ABTS tertinggi, $IC_{50} = 22,74 \pm 0,67$, $20,89 \pm 0,17$ μ g/ml, berturut-turut, diikuti oleh ekstrak kasar air buah dan akar dengan $IC_{50} = 33,08 \pm 0,26$, $44,24 \pm 0,49$ μ g/ml pada DPPH, dan $35,29 \pm 0,58$, $41,34 \pm 0,65$, berturut-turut. Selain itu, pada FRAP hasilnya bertepatan dengan hasil uji antioksidan sebelumnya. Ekstrak daging buah segar menunjukkan potensi DPPH yang lebih kuat daripada buah kering, yang menunjukkan bahwa proses pengeringan dapat memengaruhi potensi antioksidan (Chunchakant, S, dan Chaicharoenpong, C., 2021). Flavonoid adalah polifenol yang memiliki aktivitas

antioksidan signifikan melalui pembersihan radikal bebas secara langsung, diikuti oleh inaktivasi dan penghambatan peroksidasi lipid oleh kelasi ion logam (Sadžak, A, *et al.*, 2020). Hal ini dimungkinkan karena sejumlah gugus hidroksil yang ada bertindak sebagai donor hidrogen (Islama, *et al.*, 2010). QE, myricetin, dan myricitrin adalah flavonoid yang ditemukan di berbagai tanaman termasuk chicozapote. (Sadžak, A, *et al.*, 2020), mengevaluasi kapasitas senyawa-senyawa ini untuk menahan peroksidasi lipid. Meskipun merupakan antioksidan, mirisitrin menunjukkan aktivitas yang paling poten; karena terletak lebih dekat ke permukaan membran dan paling hidrofilik, ia lebih terpapar pada radikal yang akan datang dan dapat mencapainya sebelum mereka menemukan tempat reaktif di membran. Oleh karena itu, ia mampu menghambat peroksidasi lipid dalam membran dwi lapis fosfolipid. Jus chicozapote juga menunjukkan kapasitas antioksidan, berpotensi menghambat peroksidasi lipid radikal bebas dalam model liposom (Lim, TK., 2013). Meskipun sebagian besar flavonoid memiliki kapasitas antioksidan, katekin dan flavon memberikan perlindungan terkuat terhadap spesies oksigen reaktif (ROS) (Sadžak, A, *et al.*, 2020).

2.1.4 Aktivitas Farmakologi Tanaman Sawo

a. Antioksidan

Ekstrak etanol kasar kulit kayu *M. zapota* menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan secara *in vitro* dan *in vivo*. Ekstrak ini juga mengembalikan perubahan pada enzim penanda serum, bilirubin total, protein total, dan berat hati yang disebabkan oleh hepatotoksisitas yang diinduksi CCl₄ pada tikus *vivo*. Demikian pula, ekstrak etanol dingin dari daun menunjukkan efek antioksidan yang signifikan pada model *in vitro* dan *in vivo*. Dengan metode

uji radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), IC_{50} ekstrak etanol dingin dari daun ditemukan sebesar 68,27 lg/ml vivo (Islam R, *et al.*, 2013). Ekstrak aseton daun juga menunjukkan efek antioksidan yang sangat signifikan dalam aktivitas scavenging radikal DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 20 mg/ml dan dalam aktivitas scavenging anion superoksida dengan IC_{50} sebesar 140 mg/ml. Ekstrak metanol *M. zapota* menunjukkan aktivitas scavenging radikal bebas terbaik dengan metode DPPH dengan kandungan fenol total yang tinggi. (Chanda & Nagani, 2010).

Demikian pula, penelitian pada ekstrak buah dan biji telah menunjukkan aktivitas yang signifikan karena kandungan senyawa fenol dan polifenol yang tinggi, terutama dalam ekstrak metanol. Fraksinasi terarah aktivitas ekstrak metanol dari buah menghasilkan isolasi senyawa antioksidan yang kuat, 4-O-galloylchlorogenic acid dengan IC_{50} 23,5 mM dalam uji radikal bebas DPPH. Berdasarkan Penelitian (Shafii, *et al.*, 2017). Buah yang belum matang merupakan sumber antioksidan yang sangat baik. Kapasitas antioksidan buah terutama dikaitkan dengan polifenol dengan blok dasar gallocatechin atau catechin atau keduanya. Menariknya, ekstrak kulit buah menunjukkan efek antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak daging buah ketika diuji pada uji radikal bebas DPPH. Buah juga menunjukkan kapasitas penyerapan radikal oksigen hidrofilik (H-ORAC) yang tinggi.

b. Antibakteri

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk menganalisis potensi ekstrak daun *M. zapota* sebagai sumber alami agen antimikroba (Kanerria & Chandra, 2009). Sebuah penelitian melaporkan bahwa baik ekstrak etil asetat dari kulit

batang maupun daun menunjukkan aktivitas antimikroba yang variabel terhadap beberapa bakteri dan jamur. Selain itu, ekstrak tersebut juga menunjukkan sitotoksitas terhadap *nauplii* udang air asin, *Artemia salina* (Osman MA, 2011). Senyawa seperti terpenoid, flavonoid, dan glikosida telah terbukti menunjukkan sifat antimikroba. Demikian pula, ekstrak biji *M. zapota* dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dan antijamur yang signifikan dibandingkan dengan standar. Ekstrak biji aseton terbukti menunjukkan aktivitas antibakteri in vitro yang penting terhadap berbagai bakteri gram positif dan gram negatif (Kothari, *et al.*, 2010). Penelitian oleh (D Mewara, *et al.*, 2017). Menunjukkan bahwa ekstrak *M. zapota* menunjukkan aktivitas antijamur terhadap *Mucor hiemalis* (MTCC No.157), *Fusarium eumartii* (MTCC No.399) dan *Candida albicans* (MTCC No. 183).

c. Antidiare

Ekstrak kulit kayu etanol dievaluasi untuk aktivitas antidiarenya dengan menggunakan metode diare yang diinduksi ekstrak sawo pada tikus. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak tersebut memiliki aktivitas antidiare, yang diyakini disebabkan oleh adanya tanin, flavonoid, alkaloid, saponin, gula pereduksi, dan sterol dalam ekstrak tanaman tersebut (Ramproshad S, *et al.*, 2012).

d. Anti Kanker

Uji aktivitas antikanker in vitro telah menunjukkan bahwa ekstrak biji dan kulit memiliki efek sitotoksik pada garis sel HeLa secara tergantung dosis dalam uji MTT dan LDH. Nilai IC₅₀ ekstrak biji adalah 4 µg/ml dan ekstrak kulit adalah 8 µg/ml. Biji memiliki efek sitotoksik yang kuat daripada kulit terhadap garis sel HeLa. Dalam penelitian in vitro sebelumnya yang dilakukan pada sel karsinoma

hepatocellular manusia, diamati bahwa ekstrak daun *M. zapota* secara signifikan mengurangi viabilitas sel dibandingkan dengan sel yang tidak diobati. (Islam, *et al.*, 2013).

2.2 Definisi Endofit dan Jamur Endofit

Endofit adalah organisme hidup yang bersimbiosis mutualisme di dalam tanaman inang. Efek menguntungkan dari endofit ini semakin penting dengan kemungkinan untuk mendapatkan senyawa baru yang penting untuk dimanfaatkan dalam bidang medis serta endofit ini berperan dalam meningkatkan produktivitas tanaman karena menghasilkan berbagai senyawa dan berinteraksi dengan mikroorganisme lain patogen dan non-patogen. Jamur endofit dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya. Apabila jamur endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan alkaloid atau metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka tidak perlu untuk memanen tanaman aslinya yang diambil sebagai simplisia karena kemungkinan besar memerlukan waktu puluhan tahun untuk menanamnya. Mikroorganisme endofit ini dapat ditemukan di jaringan tanaman seperti bunga, buah, batang, daun, akar dan biji serta merupakan pelindung bagi tanaman inang dari cekaman lingkungan dan kompetisi mikroorganisme (Widowati *et al.*, 2016).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder yang sama dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder melalui mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut. Apabila mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa-senyawa bioaktif yang langka dan penting seperti yang

dimiliki tanaman inangnya, maka endofit dapat mengurangi ketergantungan terhadap sumber bahan baku dari tanaman inangnya, dengan demikian keanekaragaman hayati yang ada dapat dipertahankan. Selain itu, penggunaan mikroba sebagai sumber produk metabolit sekunder yang berkhasiat dapat dilakukan dengan proses yang lebih mudah dan ekonomis, sehingga dapat dihasilkan produk dengan harga lebih kompetitif (Tan & Zou, 2001).

Mikroba endofit terdiri atas bakteri, fungi/jamur, dan aktinomisetes, namun yang paling banyak ditemukan adalah golongan fungi dan aktinomisetes. Mikroba endofit ini mendapat perhatian besar karena dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibiotik disebabkan oleh aktivitasnya yang besar dalam membunuh mikroba-mikroba patogen. Disamping mampu menghasilkan senyawa-senyawa anti mikroba, mikroba endofit juga mampu menghasilkan senyawa-senyawa yang berpotensi sebagai antikanker, antimalaria, anti HIV, antioksidan dan sebagainya (Prihatiningtias, 2006).

Berbagai jenis endofit telah berhasil diisolasi dari tanaman inangnya dan telah berhasil dibiakkan dalam medium pembenihan yang sesuai. Begitu pula metabolit sekunder yang dihasilkan telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya (Radji, 2005).

2.3 Antioksidan

Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat mengikat radikal bebas sehingga dapat mencegah terjadinya penyakit-penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskuler, kanker dan penyakit lainnya senyawa antioksidan diperlukan tubuh untuk menetralsir radikal bebas dan mencegah kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Senyawa

antioksidan memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa mengakibatkan gangguan pada fungsi dari senyawa antioksidan itu sendiri dan dapat memutus reaksi berantai dari radikal bebas (Parwata, 2016).

Stres oksidatif berperan penting untuk terjadinya berbagai penyakit degeneratif dan proses penuaan. Sel secara rutin menghasilkan radikal bebas dan kelompok oksigen reaktif (reactive oxygen species / ROS) yang merupakan bagian dari proses metabolisme (Sinaga Fa, 2016). Stres oksidatif adalah kondisi yang menggambarkan adanya ketidakseimbangan antara ROS atau radikal bebas dan antioksidan yang berfungsi dalam mempertahankan kondisi terhadap kerusakan jaringan yang terjadi (Arief H & Widodo MA, 2018).

Stres oksidatif terjadi apabila produksi ROS atau radikal bebas yang terbentuk AN melebihi antioksidan yang ada sebagai pertahanan intrinsik. Antioksidan diperlukan oleh tubuh untuk mengatasi dan mencegah terjadinya stres oksidatif (Werdhasari A, 2014). Antioksidan berperan aktif dalam menanggulangi kelebihan radikal bebas dengan cara menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan juga bekerja sebagai reduktor yang berfungsi untuk mencegah terjadinya oksidasi atau menetralkan senyawa yang telah teroksidasi, dengan cara menyumbangkan hidrogen atau elektron (Rahmi P & Nurman, 2021).

2.3.1 Mekanisme Kerja Antioksidan

Aktivitas Mekanisme kerja antioksidan dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

1. Menghambat enzim oksidan

Mekanisme antioksidan dengan cara menghambat enzim oksidan sehingga terjadi penurunan produksi ROS atau RNS. Beberapa enzim oksidan yang dapat memproduksi ROS/RNS adalah : NOS (Nitric Oxide Oxidase), Nox (NADPH Oxidase), COX (Cyclooxygenase) , MPO (Myeloperoxidase)

2. Berinteraksi dengan jalur sinyal redok.

Mekanisme antioksidan yang berinteraksi dengan jalur sinyal redok, sehingga terjadi aktivasi nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf-2) dan penghambatan NF- κ B yang akan mengaktifkan respon antioksidan seluler dengan meningkatkan aktifitas antioksidan enzim dalam mencegah terjadinya kerusakan oksidatif. Antioksidan enzim dapat berupa katalase (CAT), Superoksid Dismutase (SOD), Peroksidase (Prx), Gluthation Peroksidase (GPx), Thioredoxin (Trx), Thioredoxin Reduktase (TR), Gluthation Reduktase (GR).

3. Bereaksi secara langsung dengan RNS/ROS.

Antioksidan bereaksi secara langsung dengan ROS/RNS dengan membentuk senyawa yang kurang toksik atau membentuk senyawa yang kurang reaktif. (Lopez, *et al.*, 2013)

2.3.2 Struktur, Klasifikasi dan Karakteristik Antioksidan

Antioksidan terdiri dari beberapa jenis dan memiliki mekanisme penghambatan yang berbeda-beda antara spesies satu dengan spesies yang lain. Terdapat berbagai jenis dan struktur antioksidan. Dalam sub bab ini penulis memberikan gambar struktur kimia antioksidan β -carotene, catechin, astaxanthin, phycocyanobilin.

2.3.3 Jenis – jenis Antioksidan

A. Pembagian antioksidan berdasarkan cara kerjanya

1. Antioksidan pencegah.

Antioksidan pencegah bekerja dengan cara mencegah terjadinya akumulasi antioksidan lain.

2. Antioksidan pemutus Rantai.

Antioksidan pemutus rantai bekerja dengan cara mencegah propagasi dari reaksi berantai yang diinisiasi oleh radikal bebas.

B. Pembagian antioksidan berdasarkan aktivitasnya

1. Antioksidan enzimatik.

Antioksidan enzimatik bekerja membongkar dan menghilangkannya. Antioksidan enzimatik ini mengubah produk oksidatif yang berbahaya menjadi hidrogen peroksida dan kemudian diubah menjadi air. Contohnya: katalase, Superoksid dismutase (SOD)

2. Antioksidan non enzimatik.

Antioksidan non enzimatik bekerja dengan cara memutuskan reaksi berantai radikal bebas. Antioksidan non enzimatik dibagi lagi menjadi:

a. Antioksidan metabolik.

Antioksidan metabolik merupakan antioksidan endogen, yang diproduksi melalui proses metabolisme di tubuh. Contohnya : asam lemak, glutathione, asam urat, L-arginin, koenzim Q10, melatonin, bilirubin, dan lainnya.

b. Antioksidan nutrisi.

Antioksidan nutrisi merupakan antioksidan eksogen yang

komposisinya tidak dapat disintesis di dalam tubuh, sehingga harus diperoleh dari makanan atau suplemen. Antioksidan nutrisi telah terbukti terlibat dalam detoksifikasi ROS dan berperan penting dalam membantu antioksidan endogen menetralkan stres oksidatif. Kekurangan antioksidan nutrisi diketahui memberikan peran penting pada terjadinya penyakit kronis dan penyakit degeneratif. Contohnya: vitamin E, vitamin C, karoten, polifenol, selenium, zinc dan lainnya.

C. Pembagian antioksidan berdasarkan kelarutannya terhadap lemak atau air

1. Antioksidan larut air

Antioksidan ini bersifat hidrofilik/larut air yang terdapat pada cairan sel seperti sitosol atau matrik sitoplasma. Contohnya: vitamin C.

2. Antioksidan larut lemak

Antioksidan yang bersifat lipofilik/larut lemak yang terdapat pada membran sel. Contohnya: vitamin E

2.3.3 Metode Uji Antioksidan

2.3.3.1 *Hydrogen Atom Transfer (HAT)*

Metode yang digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas dengan mendonorkan atom H. Efektif digunakan untuk komponen fenolik dan dalam pengujiannya menggunakan senyawa pewarna yang merupakan suatu radikal bebas. Pada pengujian, ditandai adanya aktivitas antioksidan dengan perubahan warna, dari yang berwarna menjadi tidak berwarna. Jika dibandingkan dengan metode SET, maka metode ini jauh lebih dominan. Contohnya adalah pengujian menggunakan metode ABTS dan *Hydroxyl radical scavenging assay* (ORACOH).

a. ORAC (*Oxygen Radical Absorption Capacity*)

Uji ORAC mengukur kemampuan pemecahan reaksi berantai radikal bebas oleh antioksidan melalui pemantauan penghambatan oksidasi radikal peroksil. Radikal peroksil dicirikan sebagai radikal bebas yang mendominasi oksidasi lipid dalam sistem biologis dan makanan dalam kondisi fisiologis. Akibatnya nilai ORAC disebut oleh peneliti sebagai nilai yang relevan secara biologis dan sebagai tolak ukur efisiensi antioksidan. Generator radikal peroksil yang umum digunakan dalam pengujian ini yaitu oleh senyawa azo, termasuk lipofilik a,a-azobisisobutyronitril (AIBN), 2,2-azobis (2-amidinopropane) klorhidrat (ABAP), 2,2'-azobis (2,4-dimetilvaleronitril) (AMVN) dan hidrofilik 2,2'-azobis (2amidin opropana) dihidroklorida (AAPH). Tes ORAC menggambarkan kemampuan antioksidan untuk menghasilkan atom hidrogen (Becker, *et al.*, 2004).

b. HORAC (*The Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity*)

Metode HORAC mengevaluasi kemampuan proteksi terhadap pembentukan radikal hidroksil melalui kompleks Co(II). Fluorescein diinkubasi dengan sampel untuk dianalisis, kemudian campuran Fenton (Generator radikal hidroksil) ditambahkan. Fluoresensi asli diukur, kemudian pembacaan dilakukan setiap menit setelah pengadukan. Larutan standar asam galat dengan konsentrasi yang berbeda digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Uji Kapasitas Antioksidan Radikal Hidroksil (HORAC) memberikan pengukuran langsung kapasitas antioksidan terhadap radikal hidroksil dengan mengganggu reaksi radikal. (M Číž, *et al.*, 2010).

c. TRAP

Uji TRAP didasarkan pada kapasitas antioksidan untuk menghambat reaksi antara radikal peroksil dan molekul target, yang awalnya mewakili konsumsi O₂ (sebagai sampel) dalam proses peroksidasi yang dipicu oleh dekomposisi termal 2,2' azobis(2-amidinopropana) dihidroklorida (ABAP). Waktu perlambatan penyerapan O₂, yaitu periode induksi. Dapat diukur secara kuantitatif dan digunakan untuk menyatakan kapasitas antioksidan total sampel sebagai nilai TRAP. Metode ini telah dimodifikasi beberapa kali menggunakan rentang sampel yang lebih luas, inisiator dan pengukuran titik akhir, misalnya enzim AAPH dan peroksidase digunakan sebagai inisiator, dan fluorescein, dihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) dan luminol sebagai pengukuran titik akhir reaksi (R Apak, *et al.*, 2016).

d. TOSC

Uji TOSC didasarkan pada penghambatan pembentukan etilen (reaksi kontrol dipantau dengan kromatografi gas) dengan adanya senyawa antioksidan yang bersaing dengan asam α -keto- γ -bethylbutiric (KMBA) untuk ROS. Tes ini menggunakan area di bawah kurva konsentrasi etilen dibandingkan dengan waktu reaksi (sampai 300 menit) (R Apak, *et al.*, 2016).

2.3.3.2 SET (Single Electron Transfer)

Tes yang didasarkan pada transfer satu elektron, yang juga disebut tes transfer elektron (ET), mendeteksi kemampuan antioksidan untuk mentransfer elektron guna mengurangi ion logam, kelompok karbonil, dan radikal bebas.

Reaktivitas relatif dalam metode SET terutama didasarkan pada deprotonasi dan potensi ionisasi dari kelompok fungsional reaktif. Oleh karena itu, reaksi SET

bergantung pada pH (R Apak, *et al.*, 2016).

a. CUPRAC

Uji CUPRAC untuk menentukan kapasitas antioksidan total dirancang pada awal tahun 2000-an, tetapi telah dimodifikasi untuk berbagai metode pengukuran aktivitas antioksidan berdasarkan reduksi tembaga (Cu^{2+}) menjadi tembaga (Cu^{+}). Mirip dengan pengujian lainnya, ligan digunakan untuk membentuk kompleks tembaga-ligan untuk memfasilitasi pengukuran daya serap. Neocuproine (Nc; 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) adalah ligan yang biasa digunakan dalam uji CUPRAC. Metode ini telah diterapkan pada berbagai matrik yang mengandung antioksidan lipofilik dan hidrofilik. Metode ini dapat digunakan untuk penentuan kapasitas antioksidan konstituen makanan dengan pereaksi Cu^{2+} -neocuproine sebagai agen pengoksidasi kromogenik.

b. Metode FRAP

Tes FRAP adalah metode berbasis SET yang mengukur reduksi kompleks ion ferik (Fe^{3+}) dengan ligan menjadi kompleks ferrous yang berwarna biru intens (Fe^{2+}) dengan bantuan antioksidan dalam lingkungan asam. Aktivitas antioksidan ditentukan sebagai peningkatan absorbansi pada 593 nm, dan hasilnya dinyatakan dalam ekuivalen mikromolar Fe^{2+} atau relatif terhadap antioksidan standar. Berbeda dengan metode berbasis SET lainnya, tes FRAP dilakukan dalam kondisi pH asam ($\text{pH} = 3,6$) untuk menjaga kelarutan besi. Reaksi pada pH rendah mengurangi potensi ionisasi yang mendorong transfer elektron dan meningkatkan potensi redoks, yang menyebabkan perubahan mekanisme reaksi dominan.

Tes FRAP asli menggunakan tripiridiltriazina (TPTZ) sebagai ligan pengikat ion besi, namun ligan alternatif seperti ferrozine juga digunakan untuk

menilai daya reduksi asam askorbat. Baru-baru ini, kalium ferrisianida menjadi reagen ferik yang paling umum digunakan dalam tes FRAP. Dalam kasus ini, biru Prusia diperoleh sebagai produk akhir yang dapat diukur secara spektrofotometri dan menunjukkan daya reduksi dari antioksidan yang diuji. Pembentukan biru Prusia dapat terjadi dengan dua cara berbeda namun menghasilkan hasil yang sama. Antioksidan dapat mereduksi Fe^{3+} dalam larutan menjadi Fe^{2+} , yang mengikat ferrisianida untuk menghasilkan biru Prusia, atau mereduksi ferrisianida menjadi ferrosianida, yang mengikat Fe^{3+} bebas dalam larutan dan membentuk biru Prusia.

3.3 Uji Mode Campuran (HAT/SET)

Uji mode campuran ini umumnya didasarkan pada penghilangan fasa kromofor yang stabil (seperti 2,2'-Azinobis-3-Etilbenzthiazolin-6-Asam sulfonat (ABTS) dan 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH)), di mana mekanisme HAT, ET, dan transfer elektron berpasangan proton (proton-coupled electron transfer/PET) dapat memainkan peran yang berbeda dalam proporsi yang bervariasi, tergantung pada kondisi reaksi yang sesuai (seperti pH dan pelarut). Uji mode campuran (HAT/SET) terutama mencakup uji kapasitas antioksidan setara ABTS/Trolox (TEAC), uji netralisasi radikal DPPH, dan uji netralisasi radikal N, N-dimetil-p-fenilendiamin dihidroklorida (DMPD).

a. Tes ABTS (TEAC)

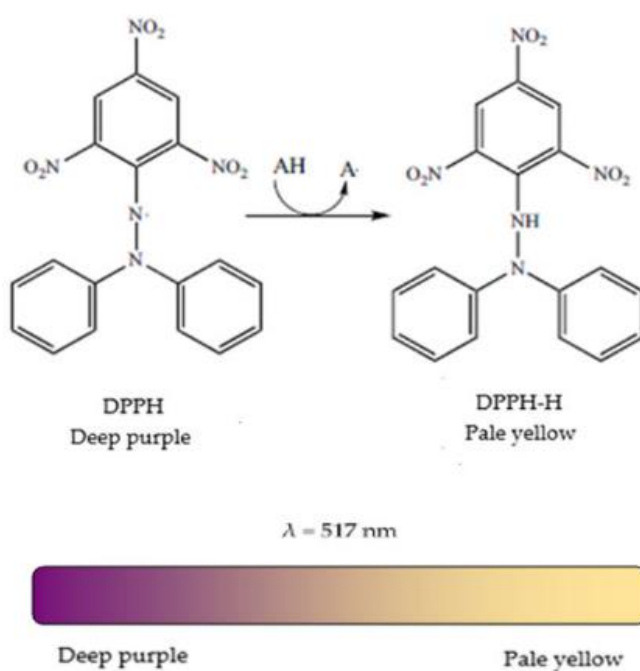
Tes TEAC pertama kali dikembangkan oleh Miller, *et al.*, (1993) sebagai metode yang sederhana dan mudah digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan total (TAC). Tes ini mengukur kapasitas antioksidan untuk menetralkan 2,2'-Azinobis (3-Etilbenzthiazolin-6-Asam sulfonat) (ABTS -+)

kation radikal yang stabil, sebuah kromofor biru-hijau yang memiliki serapan maksimum pada 734 nm, yang intensitasnya menurun jika ada antioksidan. ABTS $\cdot+$ dapat dihasilkan dari ABTS dengan adanya zat antioksidan yang kuat. Tingkat perubahan warna biru-hijau, yang diukur sebagai penurunan absorbansi secara tiba-tiba hingga 734 nm, bergantung pada durasi reaksi, aktivitas antioksidan intrinsik, dan konsentrasi sampel. Pada uji TEAC yang asli, metmyoglobin dan hidrogen peroksida digunakan untuk menghasilkan radikal perantara feritmiloglobin, yang kemudian bereaksi dengan ABTS untuk menghasilkan ABTS $\cdot+$. Kemudian, zat oksidan diganti dengan peroksida atau persulfat. Potassium persulfat adalah oksidan yang paling umum untuk generasi ABTS $\cdot+$. Seperti yang dapat dilihat pada reaksi di bawah ini, dalam sistem yang dibentuk oleh ABTS / H₂O₂ / peroksidase, ABTS berperilaku sebagai agen pereduksi, menggantikan bentuk enzim yang diaktifkan (dinamai senyawa I) dalam senyawa II, yang kembali ke bentuk awal enzim.

b. Uji DPPH (2,2-di (4-tert-oktilfenil) -1-pikrilhidrazil)

DPPH adalah radikal- π yang hadir dalam bentuk monomer baik dalam keadaan padat maupun dalam larutan. Struktur DPPH menunjukkan bahwa reaktivitas rendahnya terutama dipengaruhi oleh "penyaringan struktur hidrazil yang efisien oleh bagian sekitar molekul," dengan konjugasi yang diperpanjang memberikan pengaruh yang lebih kecil. Meskipun penghilangan gugus p-nitro hanya berdampak sedikit, penghilangan gugus pelindung o-nitro secara signifikan meningkatkan reaktivitas DPPH. Kedua gugus fenil yang dipelintir juga mempengaruhi stabilitas konjugasi. Radikal ini larut dalam berbagai pelarut organik, seperti metanol, etanol, atau campuran airnya, namun tidak larut dalam

air. Untuk kelarutan optimal dalam campuran air, kandungan air tidak boleh melebihi 60%, karena pada kadar air yang tinggi, spektrum DPPH berubah dari kuintet menjadi singlet, khas untuk radikal padat. Uji netralisasi DPPH didasarkan pada donasi elektron dari antioksidan untuk menetralkan radikal DPPH, yang disertai dengan perubahan warna yang diukur pada 517 nm, berfungsi sebagai indikator aktivitas antioksidan. Aktivitas ini sering dilaporkan sebagai EC50, yaitu konsentrasi antioksidan yang diperlukan untuk mengurangi konsentrasi DPPH awal sebesar 50%, dan TEC50 yang mengukur waktu yang diperlukan untuk mencapai kondisi kesetimbangan pada EC50.



Gambar 2. Mekanisme Inhibisi DPPH oleh antioksidan (AH).

2.4 Fermentasi

Istilah "fermentasi" berasal dari kata latin *fervere*. Pengertian fermentasi berbeda untuk ahli biokimia dan ahli mikrobiologi industri. Pengertian fermentasi dalam biokimia berkaitan dengan proses penghasilan energi oleh katabolisme senyawa organik, sedangkan dalam mikrobiologi industri cenderung jauh lebih luas (Stanbury, *et al.*, 2017). Pengertian fermentasi menurut (Muhiddin, *et al.*, 2001) yaitu aplikasi metabolisme mikroba untuk mengubah bahan baku menjadi produk yang bernilai lebih tinggi, seperti asam-asam organik, protein sel tunggal, antibiotika dan biopolimer. Fermentasi dapat dibedakan menjadi dua berdasarkan jenis media, yaitu fermentasi media padat dan fermentasi media cair. Fermentasi media padat adalah proses fermentasi dengan substrat tidak larut dan tidak mengandung air bebas, tetapi cukup mengandung air untuk keperluan mikroba. Fermentasi media cair adalah proses fermentasi dengan substrat yang larut atau tersuspensi dalam fase cair. Fermentasi media cair disebut fermentasi kultur terendam yang umumnya memerlukan aerasi dan agitasi. Pembentukan produk hasil fermentasi mikroba dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti substrat dan nutrien, suhu, pH, aerasi dan agitasi (Kumala, 2014).

2.5 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium, atau pelat plastik. Pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben. KLT akan memvisualisasikan senyawa-senyawa yang terkandung di dalam bahan sehingga bisa diketahui sifat-sifatnya terutama polaritas (Saifudin, 2014).

Berdasarkan (Rubiyanto, 2016), teknik dalam melakukan KLT meliputi:

1. Lapisan tipis adsorben dibuat pada permukaan plat kaca atau aluminium berukuran 5 cm x 20 cm; 20 cm x 20 cm. Untuk plat aluminium, ukuran dapat diperkecil dengan memotongnya sesuai keinginan.
2. Tebal lapisan bervariasi tergantung tujuan penggunaan, adapun tebal lapisan yang standard untuk plat KLT yang diperdagangkan umumnya $\pm 250 \mu\text{m}$.
3. Larutan campuran senyawa diteteskan pada jarak tertentu dari dasar plat ($\pm 1,5$ cm) dengan menggunakan pipet mikro atau siringe untuk analisis kuantitatif dan dapat menggunakan pipa kapiler untuk analisis kualitatif.
4. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan sampel diuapkan dulu dengan membiarkan sejenak plat setelah ditotol dengan sampel sebelum dimasukkan ke dalam bejana pengembang (development chamber) yang berisi fasa gerak (eluen).
5. Plat kromatografi dikembangkan dengan mencelupkannya ke dalam bejana tersebut. Fasa gerak yang dipergunakan dapat terdiri atas satu macam atau lebih pelarut.
6. Komponen-komponen senyawa akan bergerak dengan kecepatan berbeda sesuai interaksi adsorbsinya dengan fasa diam.
7. Kromatografi diakhiri ketika fasa gerak telah mencapai jarak tertentu dari ujung plat. Senyawa-senyawa yang berbeda satu sama lain memiliki perbandingan jarak tempuh senyawa terhadap jarak tempuh fasa gerak yang berbeda pula. Nilai perbandingan ini dinamakan R_f (Retardation factor).

Berikut merupakan fase yang ada pada KLT :

a. Fase Diam

Beberapa jenis adsorben dan penggunaannya antara lain silika gel (asam-asam amino, alkaloid, asam-asam lemak, dan lain-lain), alumina (zat warna, fenol-fenol, dan lain-lain), kielsghur (tanah diatomae) (gula, oligosakarida, trigliserida, dan lain-lain) dan selulosa (asam-asam amino, alkaloid, dan lainlain) (Rubiyanto, 2016). Sebagai adsorben dan fase diam yang paling banyak digunakan dalam KLT adalah silika gel. Terkadang silika gel perlu ditambahkan senyawa fluoresensi dengan tujuan bila disinari sinar ultraviolet (UV) maka dapat berfluoresensi atau berpendar, sehingga dikenal dengan silica gel GF254 yang berarti silika gel dengan fluoresen berpendar pada 254 nm (Sumarno, 2001).

b. Fase Gerak

Karakter yang diinginkan dalam pemilihan fase gerak yang kompetitif untuk KLT antara lain parameter kelarutan (Solubility parameter), Indeks polaritas (Polarity index), dan kekuatannya sebagai solvent (solvent strength). Parameter kelarutan menunjukkan kemampuannya untuk berkombinasi dengan beragam pelarut lain. Indeks polaritas menunjukkan besaran empiris yang digunakan untuk mengukur ketertarikan antar molekul dalam solut dengan molekul solvent pada parameter kelarutan solvent yang bersangkutan dalam keadaan murninya (Rubiyanto, 2016). Berdasarkan (Rubiyanto, 2016), sifat-sifat ideal pelarut yang digunakan dalam KLT antara lain :

1. Tersedia dalam bentuk yang sangat murni dan harga yang memadai.
2. Tidak bereaksi dengan komponen dalam sampel maupun material fasa dalam.
3. Memiliki titik didih yang rendah untuk memudahkan pengeringan setelah pengembangan.
4. Memiliki kelarutan yang ideal pada berbagai campuran.
5. Tidak toksis dan mudah pembuangan limbahnya.

2.6 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis memiliki radiasi pada panjang gelombang 200-700 nm yang dilewatkan melalui suatu larutan senyawa. Elektron-elektron pada ikatan di dalam molekul menjadi tereksitasi sehingga menempati keadaan kuantum yang lebih tinggi dan dalam proses menyerap sejumlah energi yang melewati larutan tersebut. Semakin longgar elektron tersebut ditahan di dalam ikatan molekul, semakin panjang gelombang radiasi yang diserap (Watson, 2009).

Komponen spektrofotometri UV-Vis terdiri dari sumber cahaya, monokromator dan detektor. Sumber cahaya yang biasa digunakan adalah lampu deuterium dan lampu tungsten. Monokromator merupakan diffraction grating yang berperan untuk menyebarkan sinar beam ke komponen panjang gelombang. Cahaya yang melalui sampel akan mencapai detektor yang merekam intensitas cahaya transmisi. Detektor yang sering digunakan untuk instrumen modern adalah fotodiode (Pavia, *et al.*, 2001).

Pengukuran dengan Spektrofotometer UV-Vis berdasarkan besarnya energi yang diabsorbansi atau diteruskan oleh suatu zat, sehingga larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap cahaya monokromatik akan mengakibatkan

terjadinya pemantulan, penyerapan atau penerusan dari cahaya tersebut (Harmita, 2006). Panjang gelombang yang digunakan untuk uji antioksidan adalah panjang gelombang maksimum absorbansi. Variasi ukuran panjang gelombang maksimum yang digunakan untuk pengukuran adalah 515 nm, 516 nm, 517 nm, 518 nm dan 520 nm (Molyneux, 2004).

