

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radikal bebas

Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya sehingga relatif tidak stabil. Untuk menjadi stabil, molekul yang bersifat reaktif tersebut mencari pasangan elektronnya, sehingga disebut sebagai *reactive oxygen species* (ROS). Terdapat 2 jenis ROS, yaitu :

1. Molekul oksigen dengan elektron yang tidak memiliki pasangan
2. Molekul oksigen tunggal

Radikal bebas sebenarnya diproduksi secara alamiah sebagai produk samping dari proses pembentukan energi. Radikal bebas juga dapat terpapar dari lingkungan ke dalam tubuh (eksogen) melalui asap rokok, radiasi, polusi lingkungan, sinar ultraviolet, obat-obatan tertentu, pestisida, ozon.

Radikal bebas merupakan *reactive oxygen species* (ROS) yang akan menyerang molekul disekitarnya sehingga menyebabkan reaksi berantai dan menghasilkan radikal bebas yang beragam seperti anion peroksida (O_2^-) dahydrogen peroksida (H_2O_2), hidroksi bebas (OH), asam hipoklorous (HOCl), peroksinitrat.

Radikal bebas dalam jumlah kecil digunakan pada respon seluler dan system imun. Namun pada konsentrasi yang tinggi radikal bebas dapat menghasilkan stress oksidatif yang menyebabkan kerusakan struktur sel termasuk kerusakan lipid, protein, dan DNA. Adanya radikal bebas dalam tubuh juga dapat menjadi penyebab dari berbagai penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, jantung, ginjal, diabetes, katarak, penuaan dini. Substansi penting yang dapat membantu melindungi tubuh dan mengurangi dampak negatif dari serangan radikal bebas adalah antioksidan.

B. Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang mampu menetralkan senyawa radikal bebas sehingga kematian sel dapat dihindari. Antioksidan adalah senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, menahan oksigen reaktif atau radikal bebas dalam tubuh. Antioksidan ditujukan untuk mencegah dan mengobati penyakit seperti aterosklerosis, stroke, diabetes, alzheimer, dan kanker (Aqil *et al.*, 2006).

Berdasarkan sumbernya antioksidan dibagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetik (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa bahan kimia). Sedangkan menurut mekanisme kerjanya antioksidan dibagi menjadi 3 golongan yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier.

Antioksidan primer disebut juga sebagai antioksidan enzimatis, antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase, katalase dan glutathione peroxidase. Enzim-enzim ini bekerja dengan cara menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi), dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil.

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non enzimatis. Cara kerja non enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas. Akibatnya radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler. Contoh antioksidan sekunder yaitu vitamin E, vitamin C, flavonoid.

Antioksidan tersier contohnya enzim DNA-repair dan glutathione sulfotransferase yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).

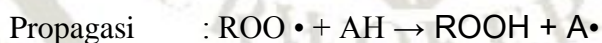
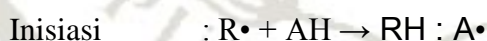
Antioksidan berperan untuk mengurangi efek radikal bebas melalui:

1. Mengikat / scavenging ($R + PH \rightarrow RH + P$)
2. Menghambat/inhibisi ($RO_2 + PH \rightarrow ROOH + P$)
3. Proteksi ($ROOH + PH \rightarrow ROH + POH$)

Dimana R sama dengan komponen bervariasi dan PH antioksidan protektif yang mampu memberikan ion hidrogen (Wanashundara dan Shahidi, 2005).

C. Mekanisme Kerja Antioksidan

Menurut mekanisme kerjanya antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama merupakan fungsi utama dari antioksidan yaitu sebagai pemberi atom hidrogen. Antioksidan (AH) yang mempunyai fungsi utama disebut antioksidan primer. Senyawa ini dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lipida ($R\cdot$, $ROO\cdot$) atau mengubahnya ke bentuk stabil, sementara turunan radikal antioksidan ($A\cdot$) tersebut memiliki keadaan lebih stabil dibandingkan radikal lipid. Fungsi kedua merupakan fungsi sekunder antioksidan, yaitu memperlambat laju antioksidan dengan berbagai mekanisme di luar mekanisme pemutusan rantai oksidasi dengan mengubah lipida ke bentuk stabil (Richa, 2009). Penambahan antioksidan (AH) primer dengan konsentrasi rendah pada lipida dapat menghalangi reaksi oksidasi pada tiap inisiasi maupun propagasi. Radikal-radikal antioksidan ($A\cdot$) yang terbentuk pada reaksi tersebut stabil dan tidak mempunyai cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipida lain membentuk radikal lipida baru. Radikal-radikal antioksidan dapat saling membentuk produk non radikal. Reaksi penghambatan antioksidan primer terhadap radikal lipid sebagai berikut :



D. BIT (*Beta vulgaris*L)

1. Sistematika tumbuhan

Dalam taksonomi umbi bit, *Beta vulgaris* L diklasifikasikan sebagai berikut (Splittstoesser, 1984) :

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Caryophyllales
Famili : Chenopodiaceae
Genus : Beta
Spesies : *Beta vulgaris* L

Bit merupakan tanaman semusim yang berbentuk rumput. Batang bit sangat pendek, hampir tidak terlihat. Akar tunggangnya tumbuh menjadi umbi. Daunnya tumbuh terkumpul pada leher akar tunggal (pangkal umbi) dan berwarna kemerahan (Steenis, 2005). Umbi berbentuk bulat atau menyerupai gasing. Akan tetapi, ada pula umbi bit berbentuk lonjong. Ujung umbi bit terdapat akar. Bunganya tersusun dalam rangkaian bunga yang bertangkai panjang banyak (racemus) (Sunarjono, 2004).

2. Kandungan kimia

Bit atau *Beta vulgaris* memiliki kandungan betasianin dan betaxanthin (Chakole *et al.*, 2011). Bit juga mengandung karotenoid, asam folat, fenolik, dan flavonoid (Kapur *et al.*, 2012). menurut penelitian yang dilakukan Widawati (2013) bit mengandung alkaloid, saponin, tanin, sterol, dan triterpen.

3. Efek farmakologi

Bit memiliki khasiat sebagai antiinflamasi, antibakteri, antioksidan. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Canadavonic *et al.* (2011) bahwa dari ekstrak metanol umbi bit diperoleh IC₅₀ sebesar 130 ppm. Penelitian lain

juga menyebutkan bahwa dari ekstrak metanol umbi bit didapat IC₅₀ sebesar 89,52 ppm (Biondo *et al.*, 2013).

E. Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L)

1. Sistematika tumbuhan

Tanaman Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) memiliki kedudukan dalam klasifikasi sebagai berikut (Wijayanti, 2010) :

Kingdom	:Plantae
Ordo	:Malvales
Keluarga	:Malvaceae
Genus	:Hibiscus
Species	:Sabdariffa
Nama Latin	:Hibiscus sabdariffa

2. Kandungan kimia

Rosella memiliki kandungan antosianin atau antioksidan yang sangat tinggi, antosianin ini dapat mencegah kerusakan sel karena penyerapan sinar ultra violet yang berlebih sehingga dapat melindungi sel-sel yang dapat berubah akibat radikal bebas (Wijayanti, 2010).

Asam organik yang terkandung di dalam kelopak bunga rosella antara lain asam suksinat, asam oksalat, serta asam askorbat dalam jumlah yang lebih besar dibandingkan dengan jeruk dan mangga (Fasoyiro *et al.*, 2005). Kelopak rosella juga mengandung vitamin A, riboflavin, niacin, kalsium, besi, alkaloid, asam sitrat, galaktosa, mukopolisakarida, kuersetin, kandungan fenolik seperti antosianin, flavonoid (gossypetin, hibiscetin dan saderetin), glikosida (asam protokatekat, eugenol) (Fasoyiro *et al.*, 2005).

3. Efek farmakologi

Tanaman Rosella atau yang memiliki nama latin *Hibiscus Sabdariffa* L, ini dapat berkhasiat diuretik (melancarkan air seni),

antiseptik menurunkan panas, meluruhkan dahak, antiradang, antihipertensi, antibakteri dan memperlancar buang air besar (menstimulasi gerak peristaltik usus). Pada bagian kelopak bunga rosella juga bermanfaat untuk mengatasi panas dalam, sariawan, kolesterol tinggi, gangguan jantung, sembelit, mengurangi resiko osteoporosis dan mencegah kanker darah (Rostinawati, 2009). Sebagai obat tradisional kelopak bunga rosella digunakan sebagai antiseptik, aprodiasiak, adstringen, dan digestif (Watana, R. dan Arunporn, L. 2007). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hamzah *et al.* (2014) bahwa bunga rosella memiliki kemampuan menangkap radikal DPPH yang cukup baik dengan harga IC₅₀ sebesar 38,44 ppm. Hasil dari penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak metanol rosella memiliki IC₅₀ sebesar 74,21 ppm (Lukitaningsih *et al.*, 2013)

F. Metode Uji Aktivitas Antioksidan

Metode uji untuk menentukan aktivitas antioksidan antara lain :

1. Uji DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazin)

Menurut Bendra (2012) DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu kamar dan sering digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. Prinsip uji DPPH adalah penghilang warna untuk antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH dengan pemantauan absorbansi dengan panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Radikal DPPH dengan nitrogen organik terpusat adalah radikal bebas stabil dengan warna ungu gelap yang ketika direduksi menjadi bentuk nonradikal oleh antioksidan menjadi warna kuning.

Prinsip dari uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yaitu reaksi penangkapan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas DPPH untuk mendapatkan pasangan elektron dan mengubahnya menjadi difenil pikril hidrazin (DPPH-H). Metode peredaman radikal DPPH ini berdasarkan reaksi reduksi larutan metanol radikal DPPH yang berwarna oleh penghambatan radikal bebas. Prosedurnya melibatkan

pengukuran penurunan serapan DPPH pada panjang gelombang maksimum yang sebanding dengan konsentrasi penghambat radikal bebas yang ditambahkan ke larutan DPPH.

Aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai *Inhibition concentration* 50 % merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan penghambatan proses oksidasi sebesar 50 %. Semakin kecil nilai menunjukkan semakin tingginya aktivitas antioksidan suatu senyawa. Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan sangat tinggi jika nilai kurang dari 50 $\mu\text{l/mL}$, dikatakan memiliki aktivitas antioksidan tinggi jika nilai 50-100 $\mu\text{l/mL}$, aktivitas antioksidan sedang jika nilai 100-150 $\mu\text{l/mL}$, dan dikatakan aktivitas antioksidan rendah jika nilai lebih dari 150 $\mu\text{l/mL}$ (Blois, 1958).

2. Uji ABTS (Asam 2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat)

Prinsip Uji ABTS adalah penghilang warna kation ABTS untuk mengukur kapaitas antioksidan yang langsung beraksi dengan radikal kation ABTS. ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang mempunyai warna karakteristik biru-hijau yang bila tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi nonradikal, dari berwarna menjadi tidak berwarna. Kemampuan aktivitas antioksidan secara spektrofotometer pada panjang gelombang 734. Hasilnya dibandingkan dengan standar yakni senyawa trolox (Bendra, 2012)

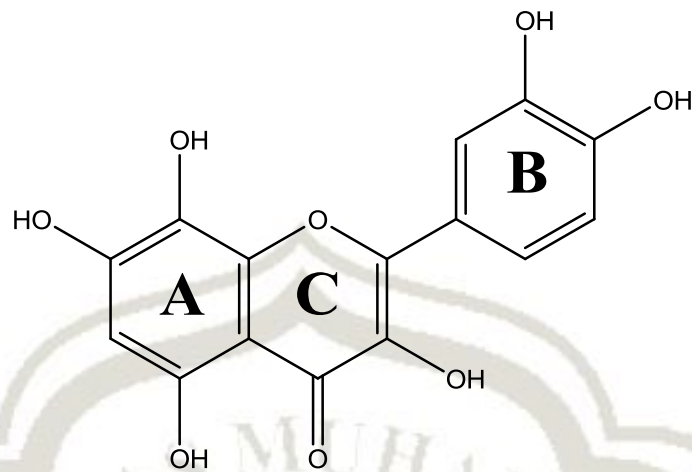
3. Uji Penghambatan Radikal Superoksida

Uji ini mengukur antioksidan menggunakan molekular *nitroblue tetrazolium* (NBT), dalam meredam radikal superoksida yang dihasilkan sistem enzimatis hipoxantin-xantin oksidase (HPX- XOD).NBT memiliki warna kunin yang oleh radikal superoksid membentuk formazan yang berwarna biru, dan terukur pada panjang gelombang 560 nm dengan spektrofotometer.Kemampuan ekstrak untuk penghambatan warna hingga 50% diukur dalam(Bendra, 2012).

G. Senyawa Fenol dan Flavonoid Sebagai Antioksidan

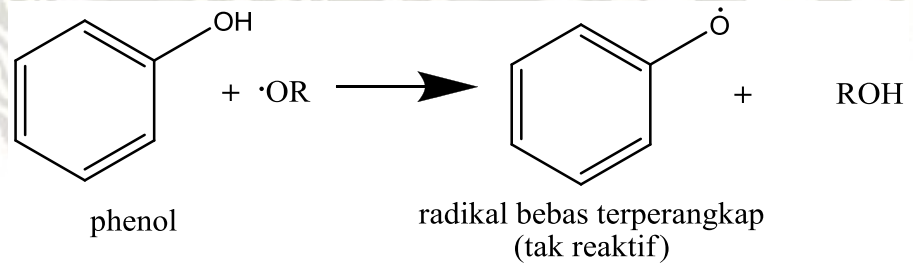
Senyawa fenol merupakan kelas utama antioksidan yang berada dalam tumbuh-tumbuhan. Senyawa ini diklasifikasikan dalam dua bagian yaitu fenol sederhana dan polifenol (Marinova *et al.*, 2005). Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Umumnya mudah larut dalam air, karena sering kali berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Contohnya katekol dengan 2 gugus OH, pirogallol dengan 3 gugus OH, dan asam galat. Sedangkan senyawa polifenol contohnya fenil propanoid, tanin, flavonoid, dan beberapa terpenoid. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol (Harbone, 1987). Penentuan kandungan total fenol dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Metode ini berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenolat (Huang *et al.*, 2005).

Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat antioksidan melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara menyumbangkan satu elektron kepada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas, sehingga jumlah radikal bebas menjadi berkurang. Didalam tumbuhan flavonoid biasanya berikatan dengan glikosida. Molekul yang berikatan dengan gula tadi disebut glikon. Aglikon flavonoid adalah polifenol, oleh karena itu mempunyai sifat fenol (Harborne, 1987). Flavonoid mudah mengalami perusakan karena panas, kerja enzim dan pH (Yuswantina. R, 2009).



Gambar 2.2 struktur flavonoid dengan aktivitas antiradikal tinggi

Polifenol merupakan suatu kelompok antioksidan yang secara alami terdapat pada sayur-sayuran, buah-buahan, dan minuman seperti teh dan anggur. Polifenol ini mempunyai kemampuan untuk menghambat reaksi oksidasi dan menangkap radikal bebas. Selain itu, polifenol juga mempunyai aktivitas sebagai antioksidan dan antiradikal.



Gambar 2.3 Struktur fenol terhadap senyawa radikal