

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Tanaman temu hitam telah digunakan oleh masyarakat secara turun temurun sebagai obat herbal untuk mengobati berbagai macam penyakit yaitu gangguan pencernaan, gangguan otot, penyakit kulit, penyakit dalam, gangguan pernapasan, membersihkan darah, demam, masuk angin, menghilangkan bau badan, penambah nafsu makan, kolesterol, keputihan, cacingan dan sakit gigi (Kuntorinin, 2015). Temu hitam merupakan tanaman obat dalam bentuk rimpang dari keluarga *Zingiberaceae* yang banyak ditemui di berbagai lokasi di Indonesia (Bos *et al.*, 2007). Tumbuhan ini mengandung saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri (Syamsuhidayat dan Hutapea, 1991).

Aktivitas antioksidan dari rimpang temu hitam yang menggunakan berbagai pelarut antara lain air, etanol 70% dan etanol 96% menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang baik daripada ekstrak yang menggunakan pelarut lain, serta temu hitam menunjukkan adanya metabolit sekunder saponin dan triterpenoid (Nurcholis, 2015). Ekstrak etanol 96% rimpang temu hitam mengandung saponin, flavonoid, tannin dan steroid (Purnomo, 2017). Rimpang temu hitam memiliki kemampuan menghambat radikal bebas atau sebagai antioksidan (Armimi, 2016).

Kandungan fenolik total pada ekstrak methanol rimpang temu hitam yaitu 43,2 mg/g ekstrak dengan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan metode FRAP menghasilkan nilai IC_{50} yaitu 292,3 $\mu g/ml$ dan 35,1 mg/g ekstrak (Indrianingsih *et al.*, 2015). Selain itu, aktivitas antioksidan ditemukan pada rimpang temu hitam ekstrak methanol (Thomas, dan Jose. 2014). Hasil penelitian Manurung (2013) memperlihatkan bahwa terdapat korelasi positif antara aktivitas antioksidan dan keberadaan senyawa fenol, flavonoid dan kurkuminoidnya. Selain itu, korelasi yang linear juga ditunjukkan oleh aktivitas antioksidan dan kandungan total fenolnya (Manurung, 2013).

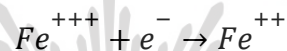
Ekstrak etanol 95% rimpang temu hitam mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan metode FRAP masing-masing yaitu 2,67 mg/ml dan

19,78±0.18 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$. Sehingga dari hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak rimpang temu hitam mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat ($\text{IC}_{50} < 50 \text{ ppm}$) (Phalanisong, 2018).

B. Landasan Teori

1. Oksidan dan Radikal bebas

Secara biokimia, oksidasi merupakan proses pelepasan elektron dari suatu senyawa. Sedangkan reduksi adalah proses penangkapan elektron. Senyawa yang dapat menarik atau menerima elektron disebut oksidan atau oksidator, sedangkan senyawa yang dapat melepaskan atau memberikan elektron disebut reduktan atau reduktor (Winarsi, 2007). Dalam ilmu kimia, pengertian oksidan adalah senyawa penerima elektron (*electron acceptor*), yaitu senyawa yang dapat menarik elektron misalnya ion ferri (Fe^{+++}).



Para ahli biokimia menyebutkan bahwa radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas didefinisikan sebagai suatu molekul, atom atau beberapa grup atom yang mempunyai satu atau lebih electron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Molekul atau atom tersebut sangat labil dan mudah membentuk senyawa baru. Terdapat berbagai macam radikal bebas sebagai turunan dari karbon (C) dan nitrogen (N), akan tetapi yang paling banyak dipelajari adalah radikal oksigen (Muchtadi, 2013).

Radikal bebas yang terdapat dalam tubuh dapat berasal dari dalam (endogen) atau dari luar (eksogen). Secara endogen, radikal bebas terbentuk sebagai respon normal dari rantai reaksi respirasi (pernafasan) di dalam tubuh. Sumber terbentuknya radikal bebas dalam bahan biologis adalah: enzim-enzim superoksida dismutase (SOD), sitokrom P-450, santin oksidase, lipoksigenase, siklo-oksigenase, enzim-enzim pentranspor elektron dan kuinon. Secara endogen, radikal bebas timbul melalui beberapa macam mekanisme seperti oto-oksidasi, aktivitas oksidasi (misalnya siklo-oksigenae, lipoksigenase, dehidrogenase dan peroksidase), dan sistem transpor elektron.

Radikal bebas diproduksi di dalam sel oleh mitokondria, membran plasma, lisosom, peroksisom, endoplasmik retikulum, dan inti sel. Secara eksogen, radikal bebas diperoleh dari bermacam-macam sumber antara lain polutan, makanan dan minuman, radiasi, ozon dan pestisida (residu pestisida) (Muctadi, 2013).

Radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada jaringan biologis, kerusakan tersebut dapat menyebabkan penyakit kronis, seperti iskemia, katarak, kanker, diabetes mellitus, penuaan, dan jantung coroner (Kurniawan, 2011). Mekanisme reaksi pembentukan radikal bebas terdiri atas tiga tahap, yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi. Tahap inisiasi, merupakan tahap awal pembentukan radikal bebas. Tahap kedua adalah propagasi, yaitu perubahan suatu molekul radikal bebas menjadi radikal bentuk lain (pembentukan radikal bebas baru). Tahap yang terakhir adalah terminasi. Terminasi adalah tahap dimana terjadi penggabungan dua molekul radikal bebas dan membentuk produk yang stabil. Mekanisme reaksi ketiga tahapan tersebut dapat ditulis sebagai berikut :

Inisiasi :



Propagasi :



Terminasi :



(Kurniawan, 2011)

2. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki kemampuan untuk menetralkan radikal bebas dengan cara menyumbangkan elektronnya pada molekul radikal bebas. Senyawa antioksidan dapat mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, lemak, dan

DNA. Berdasarkan sumbernya, antioksidan dikelompokkan ke dalam antioksidan endogen dan antioksidan eksogen (Kumalaningsih, 2007).

Berdasarkan fungsi dan mekanisme kerjanya antioksidan dibedakan menjadi tiga yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier.

a. Antioksidan Primer

Antioksidan primer bekerja untuk mencegah pembentukan senyawa radikal baru, yaitu mengubah radikal bebas yang ada menjadi molekul yang berkurang dampak negatifnya sebelum senyawa radikal bebas bereaksi. Antioksidan primer mengikuti mekanisme pemutusan rantai reaksi radikal dengan mendonorkan atom hydrogen secara cepat pada suatu lipid yang radikal, produk yang dihasilkan lebih stabil dari produk awal. Contoh antioksidan primer adalah Superoksida Dismutase (SOD), Glutation Peroksidase (GPx), katalase dan protein pengikat logam (Sayuti, 2015).

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder bekerja dengan cara mengkelat logam yang bertindak sebagai pro-oksidan, menangkap radikal dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Antioksidan sekunder berperan sebagai pengikat ion-ion logam, penangkap oksigen, pengurai hidroperoksida menjadi senyawa non radikal, penyerap radiasi UV atau deaktivasi singlet oksigen. Contoh senyawa antioksidan sekunder adalah Vitamin E, vitamin C, β - caroten, isoflavon, bilirubin, dan albumin (Sayuti, 2015).

c. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier bekerja memperbaiki kerusakan biomolekul yang disebabkan radikal bebas. Contoh antioksidan tersier adalah enzim-enzim yang memperbaiki DNA dan metionin sulfida reductase (Sayuti, 2015).

Antioksidan endogen dibagi menjadi dua yaitu enzim-enzim antioksidan dan non enzim antioksidan.

a. Enzim-enzim antioksidan

Berbagai macam enzim antioksidan berpartisipasi dalam proses degradasi senyawa ROS intraseluler. Enzim-enzim ini mempunyai sebuah

atom oligo-elemen pada sisi aktifnya. Yang tergolong sebagai enzim antioksidan, antara lain :

- 1) Superoksida dismutase berfungsi untuk menghilangkan superoksida.
 - 2) Katalase berfungsi untuk menghilangkan hydrogen peroksida.
 - 3) Glutation peroksidase berfungsi untuk menghilangkan hydrogen peroksida.
 - 4) Glutation disulfia reductase berfungsi untuk mereduksi glutathion teroksidasi.
 - 5) Glutation-S-transferase berfungsi untuk menghilangkan hidroperoksida lipid.
 - 6) Metionin sulfoksida reductase berfungsi untuk memperbaiki residu metionin teroksidasi.
 - 7) Peroksidase berfungsi untuk dekomposisi hydrogen peroksida dan hidroperoksida lipid.
- b. Non enzim antioksidan

Vitamin E, vitamin C, karotenoid dan vitamin A, vitamin B₂, asam lipoat, asam urat, koenzim Q, tioredoksi, bilirubin, dan melatonin. Antioksidan eksogen dapat berasal dari makanan dan tumbuh-tumbuhan. Bahan pangan yang dapat digunakan sebagai antioksidan adalah yang mengandung vitamin E, vitamin C, karotenoid dan vitamin A, vitamin B, seng (Zn), tembaga (Cu), selenium(Se) dan protein. Sedangkan tumbuhan yang dapat digunakan sebagai antioksidan adalah yang mengandung senyawa fenol (tiroso, hidroksitiroso, vanillin, asam vanilat, timol, karpakol, gingerol, zingeron), senyawa polifenol (flavonoid, flavon, flavonol, heterosida flavonoat, kalkon auron, biflavonoid), tannin (asam galat, asam elagat dan proantosianidol).

3. Senyawa Fenol dan Flavonoid sebagai Antioksidan

Istilah senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatic yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil (Harborne, 1987). Salah satu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang termasuk

dalam kelompok besar polifenol yaitu flavonoid. Flavonoid umumnya terdapat dalam tumbuhan, terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid yang mana pun mungkin saja terdapat dalam satu tumbuhan dalam beberapa bentuk kombinasi glikosida (Harbone, 1987).

Senyawa-senyawa fenolik telah dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat-sifat redoksnya. Senyawa fenolik bereaksi sebagai agen pereduksi, pemberi hydrogen, peredam oksigen singlet, dan juga sebagai pengkelat logam yang potensial (Kahkonen *et al.*, 1999; Rohman *et al.*, 2017). Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat aktivitas antioksidan melalui mekanisme penangkapan radikal dengan cara menyumbangkan satu elektron kepada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas, sehingga jumlah radikal bebas menjadi berkurang.

Semua senyawa fenol berupa senyawa aromatic sehingga semuanya menunjukkan serapan kuat di daerah spectrum UV. Selain itu, secara khas senyawa fenol menunjukkan geseran batokrom pada spektrumnya bila ditambahkan basa. Karena itu, cara spektrofotometri penting, terutama untuk identifikasi dan analisis kuantitatif senyawa fenol (Harbone, 1987).

4. Tanaman Rimpang Temu Hitam

a. Deskripsi Tanaman

Sistematika taksonomi tanaman rimpang temu hitam adalah sebagai berikut:

| | |
|-----------|-----------------------------------|
| Divisi | : Spermatophyta |
| Subdivisi | : Angiospermae |
| Kelas | : Monocotyledonae |
| Ordo | : Zingiberales |
| Famili | : Zingiberaceae |
| Genus | : Curcuma |
| Spesies | : <i>Curcuma aeruginosa</i> Roxb. |



Gambar 2.1. Tanaman Rimpang Temu Hitam

Temu hitam atau temu hitam dalam Bahasa daerah dikenal dengan beberapa nama, antara lain : temu hitam (Minang), koneng hideung (Sunda), temu hitam (Jawa), temu ereng (Madura), dan temu erang (Sumatra). Tanaman ini berasal dari Indo-Malaya, termasuk Indonesia (Rahmat, 2004; Khatimah, 2017).

Temu hitam tumbuh sebagai tera tahunan, berbatang semu, tegak sampai setinggi 2 m. Daun lebar berbentuk seperti daun pisang, berwarna merah lembayung kecokelatan, sepanjang tulang tengahnya berwarna lebih gelap. Pelepah daun menutupi seluruh batang. Bunga muncul disamping batang, mahkota bunganya merah (Setiadi *et al.*, 2007).

Tinggi tanaman temu hitam mencapai dua meter dan lebar rumpun 26,90 cm. Jika ditanam di dataran rendah, tiap rumpun dapat menghasilkan dua belas anakan, sedangkan di dataran tinggi hanya sekitar lima anakan per rumpun. Permukaan daun bagian bergaris menyirip dan pinggiran daun rata. Daun tidak berbulu dan ibu tulang daun atau kedua sisinya berwarna coklat merah sampai ungu. Ukuran panjang daun rata-rata 39,20 cm dan lebar 12,20 cm. Jumlah daun mencapai enam helai per rumpun. Tanaman ini berbunga pada umur lima bulan. Bunga berwarna ungu, sedangkan tangkai bunga berwarna hijau. Jika dipotong melintang, rimpang berwarna putih dan berbentuk cincin. Jika diiris iris, rimpang akan tampak seperti cincin berwarna biru atau kelabu. Kulit rimpang tua umumnya berwarna putih kotor, sedangkan

dagingnya kelabu. Rimpang cukup harum dan berasa getir. Kedalaman rimpang sekitar 11,60 cm, dengan panjang akar 17 cm, ketebalan rimpang muda sekitar 2,20 cm. Jumlah rimpang tua rumpun sekitar sembilan buah, sedangkan rimpang muda sekitar lima buah (Rahmat, 2004; Khatimah, 2017).

b. Kandungan Kimia

Kandungan kimia dari temu hitam (*Curcuma aeruginosa* Roxb.) adalah minyak atsiri (2%), pati, damar dan lemak (Depkes RI, 1978). Selain itu juga mengandung kurkumin, tannin, kurkumol, kurkumenol, isokurkumenol, kurzerenon, kurdion, kurkumalakton, germakron, α, β , gelemene, lindweazulene, demethoxy kurkumin, bisdemethoxy kurkumin, dan zat pembawa rasa pahit (Hariana, 2009), dan literatur lain menyebutkan bahwa temu ireng mengandung minyak atsiri (tumeron, zingiberene), kurkuminoid (kurkumin I,II, dan III) serta alkaloid, saponin, pati, damar, dan lemak (Balitro, 2006).

5. Ekstraksi dan Purifikasi Ekstrak

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut. Prinsip ekstraksi melarutkan senyawa polar dalam pelarut polar dan senyawa non polar dalam senyawa non polar. Faktor-faktor yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi adalah lama ekstraksi, suhu, jenis pelarut, titik didih, sifat toksik dan sifat korosif terhadap peralatan ekstraksi (Khopkar, 2008).

Ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan cara maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dalam pelarut organik yang digunakan pada temperature ruang. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang akan diekstraksi (Guenther, 2011). Pemilihan pelarut dalam proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperlihatkan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Khopkar, 2008). Tingkat polaritas pelarut dapat ditunjukkan secara fisika

melalui pengukuran semakin besar konstanta dielektrikum (D) suatu pelarut maka semakin polar suatu pelarut tersebut (Sudarmadji *et al.*, 2003).

Proses purifikasi adalah metode untuk mendapatkan komponen bahan alami murni bebas dari komponen kimia lain yang tidak dibutuhkan. Untuk tingkatan kemurnian (*purity*) suatu struktur senyawa tertentu, kemurnian bahan harus 95-100%. Sedangkan ekstrak terpurifikasi harus dijelaskan bahwa ekstrak terpurifikasi dari komponen apa sehingga tidak menimbulkan multipersepsi. Komponen kimia dalam ekstrak yang tidak dibutuhkan seperti lipid, pigmen (klorofil), tannin, plastisiser dan pelumas yang berasal dari alat (Nugroho *et al.*, 2013).

6. Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

a. DPPH

DPPH adalah suatu radikal yang cukup stabil (Firdiyani, 2015). Aktivitas antioksidan dapat ditentukan dengan menggunakan beberapa metode, salah satunya adalah metode DPPH. Metode ini sangat umum digunakan karena sangat sesuai untuk mengukur aktivitas total antioksidan baik dalam pelarut polar atau larut air maupun dalam pelarut nonpolar atau larut minyak (Prakash, 2001). Alasan lain dari penggunaan metode ini adalah lebih sederhana, cepat, akurat, dan tidak memerlukan banyak sampel.

Mekanisme dari pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, yaitu terjadinya perubahan warna ungu dari senyawa DPPH menjadi lebih pudar (kuning). Ketika radikal DPPH bereaksi dengan suatu senyawa antioksidan yang dapat mendonorkan radikal hidrogen, radikal DPPH akan terus tereduksi membentuk DPPH-H dan warna akan berubah dari ungu menjadi ungu pudar hampir berwarna kuning ketika elektron radikal bebas DPPH berpasangan dengan sebuah hidrogen penangkap radikal bebas dari suatu antioksidan (Firdiyani, 2015).

Serapan senyawa DPPH yang telah berubah warna akan terdeteksi pada panjang gelombang 517 nm (Hanani, 2005). Hasil pengukuran pada panjang gelombang tersebut akan berakhir pada perhitungan nilai IC₅₀

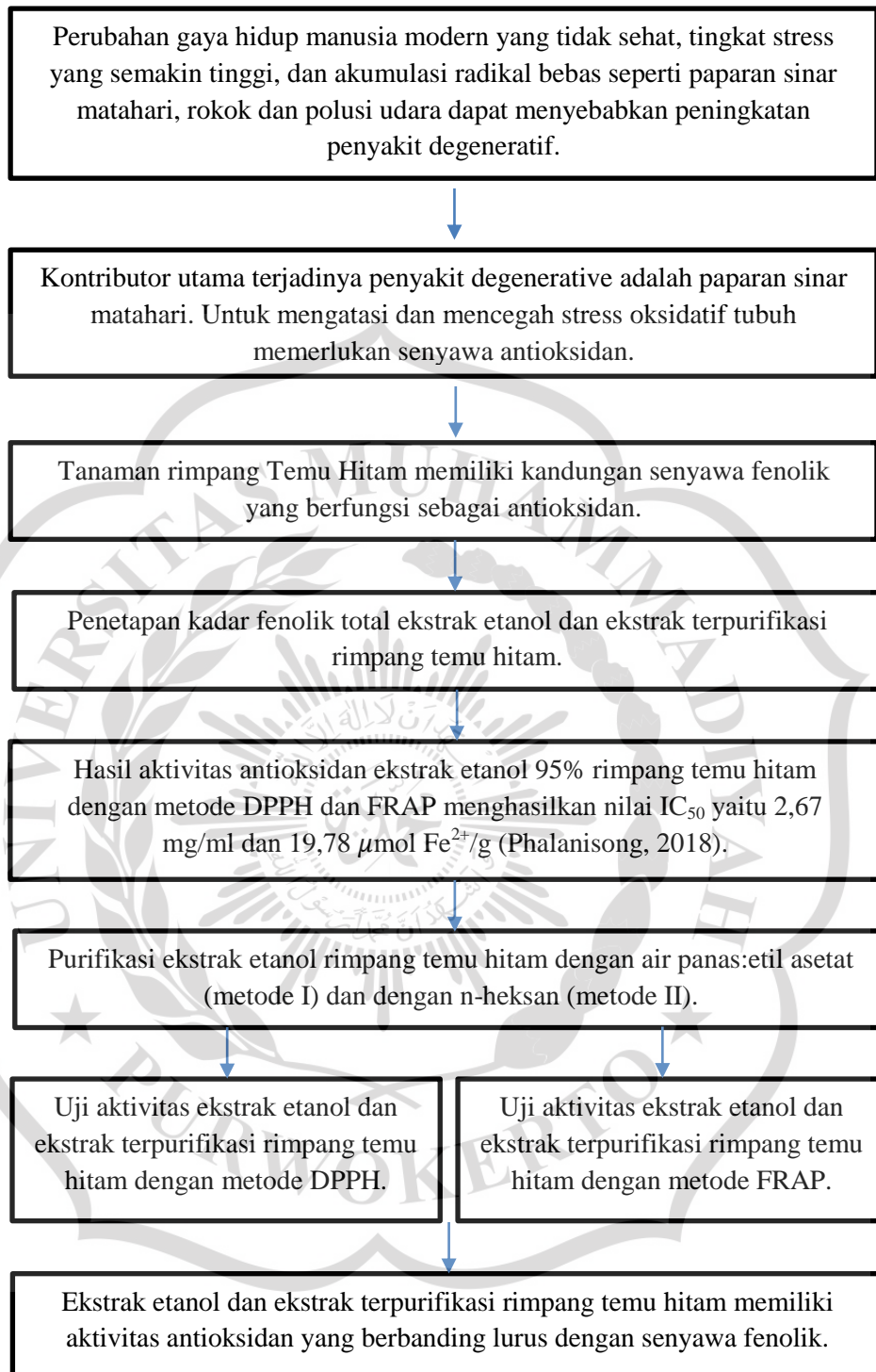
melalui persamaan regresi. Nilai ini akan menunjukkan kemampuan ekstrak sampel uji untuk menghambat radikal bebas sebanyak 50 %. Nilai IC_{50} yang lebih kecil akan menjadi indikator bahwa suatu ekstrak uji memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi (Rohman, 2005).

b. FRAP

FRAP adalah metode yang digunakan untuk menguji antioksidan dalam tumbuh-tumbuhan. Uji FRAP didasarkan pada kemampuan antioksidan untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan adanya 2,4,6-tri (2-piridil)-s triazine (TPTZ), membentuk biru intensif dari kompleks Fe^{2+} -TPTZ yang diukur pada absorbansi maksimum 593 nm, reaksi ini tergantung pH (pH optimum 3,6). Penurunan absorbansi sebanding dengan kandungan antioksidan (Chandra dan Dave, 2009).

Kelebihan metode FRAP ini yaitu metodenya murah, reagensinya mudah disiapkan, cukup sederhana dan cepat. Metode ini dapat menentukan kandungan antioksidan total dari suatu bahan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} sehingga kekuatan antioksidan suatu senyawa dianalogikan dengan kemampuan mereduksi dari senyawa tersebut (Halvorsen *et al.*, 2002).

C. Kerangka Konsep



Gambar 2.2. Kerangka Konsep

D. Hipotesis

Pada penelitian ini dapat ditarik hipotesis ekstrak etanol dan ekstrak terpurifikasi rimpang temu hitam memiliki potensi antioksidan dengan metode DPPH dan FRAP dengan adanya kandungan senyawa fenolik.