

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hasil penelitian terdahulu

Analisis GC-MS dan LC-ESI-MS menunjukkan bahwa minyak atsiri buah lada hitam memiliki senyawa kompleks yaitu β -caryophyllene (51,12%) dan β -thujene (20,58%) yang merupakan komponen dominan minyak atsiri buah lada hitam. Sifat antioksidan lada hitam dalam penelitian ini dikaitkan dengan keberadaan terpinen-4-ol dan β -caryophyllene. Hal ini menunjukkan bahwa minyak atsiri lada hitam berguna untuk pengobatan stres anti-oksidatif (Yang *et al.*, 2015).

Karakterisasi minyak atsiri lada hitam berwarna agak kehijauan, berat jenis 0,887, indeks bias 1,4857, putaran optik $-12,30^\circ$ dan kelarutan dalam etanol dengan perbandingan 1 mL minyak atsiri dalam 3 mL etanol 95% (Anggraini *et al.*, 2018). Rendemen minyak atsiri lada hitam yang diperoleh dengan metode hidrodistilasi dan oleoresin yang diperoleh dengan metode maserasi adalah $3,86 \pm 0,01\%$ dan $10,30 \pm 0,006\%$ (Morsy dan Salam, 2017).

Kuantitatif total analisis kandungan fenolik dan flavonoid buah lada hitam dilakukan dengan metode spektroskopi UV. Kandungan fenolik dan flavonoid total dalam ekstrak metanol buah lada hitam ditemukan yaitu $1,7281 \pm 0,0490$ mg / g dan $1,087 \pm 0,002$ μ g / g. Hasil ini menunjukkan bahwa Ekstrak buah lada hitam mengandung fenolik dan senyawa flavonoid (Ahmad *et al.*, 2015).

Lada hitam memiliki 6 senyawa bioaktif yaitu Piperine, Piperonylamine, Piperisida, Sarmentosin, Sarmentin dan Chavicine (Ratih, Sari, & Bare, 2020). Piperin merupakan komponen bioaktif utama dari lada, yang memberikan rasa pedas (Gorgani *et al.*, 2017a).

Penetapan kadar piperin dapat dilakukan menggunakan metode KLT densitometry. Kadar piperin tertinggi diperoleh dari ekstrak buah lada hitam menggunakan pelarut etanol 60% sebagai pelarut pengekstraksi dengan kadar $52,81 \pm 4,66$ % terhadap fraksi alkaloidnya (Dan *et al.*, 2016). Ekstrak etanol 96% buah lada hitam mengandung senyawa piperin dengan kadar sebesar 26% menggunakan analisis LC – MS (Febriyanti & Iswarin, n.d.). Analisis kandungan

piperin dari lada hitam yang diekstraksi dilakukan dengan HPLC memperoleh hasil yang diperoleh 81,4% (Gorgani et al., 2017b).

Pengujian aktivitas antioksidan non enzimatis pada tanaman umumnya dapat menggunakan metode *2,2-difenil-1-pikrilhidraziil* (DPPH) (reaksi dengan radikal bebas), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP) (reaksi reduksi-oksidasi), *Ferrous Ion Chelating* (FIC) (reaksi kelat atau melalui pembentukan kompleks). Banyaknya metode uji aktivitas antioksidan tersebut akan mempengaruhi hasil dari aktivitas antioksidan pada lada hitam (M. Metode, Setiawan, & Yunita, 2018)

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yang menggunakan pelarut methanol dan menggunakan alat spektrofotometer UV-vis memperoleh hasil yaitu untuk nilai aktivitas antioksidan *Piper nigrum* dengan nilai IC50 sebesar 57,72 µg/mL (Insanu et al., 2017). Aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menunjukkan aktivitas pada ekstrak etanol lada hitam pada konsentrasi 500 µg / ml memperoleh 77,88 ± 0,04%. Sedangkan ekstrak air lada hitam adalah 73,02 ± 0,03%. Namun, nilai IC50 ekstrak etanol lada hitam memperoleh nilai 243.15 ± 1.6 µg / ml dan ekstrak air lada hitam adalah 155.55 ± 2.8 µg / ml. sedangkan nilai IC50 asam askorbat sebagai standar adalah 6.09 ± 0,04 µg / ml (Akbar et al., 2018)

Aktivitas antioksidan minyak atsiri lada hitam yang diuji pada radikal DPPH memperoleh nilai IC50 1335,8 mg / mL (Zhang & Xu, 2015).

Pengujian flavonoid memiliki aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh harga IC50 sebesar 139,8373 mg/L (Johar et al., 2017).

Oleoresin lada hitam memiliki aktivitas antioksidan, pengujian antioksidan pada oleoresin dilakukan dengan metode DPPH memiliki nilai IC50 yaitu 107.57µg / mL (Abayomi et al., 2017).

Aktivitas pengambilan radikal dengan metode ABTS dari ekstrak etanol lada hitam yaitu 55,88 ± 0,03% dan ekstrak air lada hitam yaitu 79,83 ± 0,09%. Nilai IC50 dari ekstrak etanol lada hitam adalah 224,3 ± 1,61 µg/ml dan ekstrak air lada hitam adalah 154.02 ± 1.59µg/ml, sedangkan standar, asam askorbat memberikan nilai 4,02 µg / ml. Pengujian ekstrak etanol lada hitam dengan metode FRAP adalah 6,62 ± 0,02 sedangkan ekstrak lada hitam yaitu 6,51 ± 0,01.

Kemampuan *Ferrous Ion Chelating* menunjukkan pada ekstrak etanol menunjukkan pada konsentrasi 500 µg/ ml, memperoleh hasil ekstrak etanolik lada hitam adalah $65,90 \pm 0,07\%$ sedangkan ekstrak air lada hitam adalah $27,99 \pm 0,03\%$. Pada enzim *superoksida dismutase* (SOD) aktivitas antioksidan ekstrak etanol lada hitam yaitu $55,02 \pm 0,09\%$ sedangkan ekstrak air lada hitam yaitu $60,16 \pm 0,06\%$ (Akbar et al., 2018).

Untuk nilai yang diperoleh enzim CAT normal dalam darah mencit $34,473 \pm 8,18$ k/g Hb setelah diberikan minyak atsiri lada hitam 50 dan 100 mg/kg memperoleh nilai $42,44 \pm 11,03$ k/g Hb dan $50,64 \pm 15,54$ k/g Hb. Nilai SOD normal yaitu $478 \pm 43,97$ U/g Hb setelah diberi minyak atsiri lada hitam 50 dan 100 mg/kg diperoleh nilai yaitu $598 \pm 46,27$ U/g Hb dan $535 \pm 49,17$ U/g Hb. Nilai glutathione reductase normal $2,88 \pm 2,55$ U/g Hb, setelah diberi minyak atsiri lada hitam dengan konsentrasi dan 500 mg / kg memperoleh nilai $6,64 \pm 2,59$ U/g Hb (Taylor et al., 2014)

2.2 Dasar teori

2.2.1 Tanaman lada



Gambar 2.1 . Tanaman Lada (*Piper nigrum* Linn.) (Lukiawan & Suminto, 2018).

Lada disebut juga merica atau sahang, yang mempunyai nama latin *Piper nigrum* Linn. Lada bersifat sedikit pahit, pedas, hangat, dan antipiretik. Tanaman ini sudah mulai ditemukan dan dikenal sejak puluhan abad yang lalu . Masyarakat umumnya mengenal lada putih dan lada hitam yang sering dimanfaatkan sebagai bumbu dapur (Lukiawan & Suminto, 2018).

Klasifikasi tanaman lada (Piper, Vahl, Linn, & Piper, 2018)

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)

Subkingdom : Tracheobionata (Tumbuhan berpembuluh)

Super Divisi : Spermatophyta (Tumbuhan berbiji)

Divisi : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)

Kelas : Magnoliidae

Sub-kelas : Monocotyledonae

Ordo : Piperales

Famili : Piperaceae (Suku sirih-sirihan)

Genus : Piper

Spesies : *Piper nigrum* L

Lada hitam (*Piper nigrum* L.) merupakan tanaman rempah-rempah yang memiliki peran dalam meningkatkan perekonomian negara. Tanaman lada memiliki prospek yang sangat baik untuk dikembangkan. Lada memiliki banyak manfaat antara lain sebagai bumbu masak, bahan ramuan jamu tradisional, obat-obatan, dan sebagai campuran minyak wangi. Selain memiliki banyak manfaat, lada juga mudah dipasarkan baik dalam maupun luar negeri (Darlina, 2016).

2.2.2 Kandungan senyawa lada hitam

Lada hitam mengandung alkaloid, karbohidrat, fenolik senyawa, flavonoid, protein, saponin, lipid, tanin dan steroid (Ahmad et al., 2015). Senyawa fenolik dan flavonoid adalah antioksidan penting yang juga termasuk antimikroba, anti alergi, anti inflamasi dan antikanker (Ahmad et al., 2015). Alkaloid utama pada buah lada hitam yaitu piperin yang spektrum aktivitas terapeutik yang sangat luas (Gorgani et al., 2017a). Analisis GC-MS mengungkapkan bahwa sabinene, β -caryophyllene, limonene, α -pinene and δ -3-carene adalah komponen utama minyak atsiri buah lada hitam. Oleoresin pada

lada hitam menunjukkan adanya 28 senyawa terhitung dari jumlah total. Komponen utama dari konstituen volatil oleoresin adalah trans- β -caryophyllene (24.42%), diikuti oleh limonene (15.10%), sabinene (11.58%), α -pinene (11,08%), β -pinene (9,61%) dan δ -3-carene (6,59%) (Morsy & Abd El-Salam, 2017). Piper nigrum memiliki 6 senyawa bioaktif yaitu Piperine, Piperonylamine, Piperisida, Sarmentosin, Sarmentin dan Chavicine, Dimana Sarmentosin, senyawa turunan sarmentin, memiliki aktivitas cukup tinggi sebagai antioksidan, dan antibakteri (Ratih et al., 2020).

2.2.3 Radikal bebas

Radikal bebas adalah molekul yang kehilangan satu buah elektron dari pasangan elektron bebasnya, atau dengan kata lain, merupakan hasil pemisahan homolitik suatu ikatan kovalen. Akibat pemecahan homolitik ini suatu molekul akan terpecah menjadi radikal bebas yang mempunyai elektron tak berpasangan. Elektron memerlukan pasangan untuk menyeimbangkan nilai spinnya, sehingga molekul radikal menjadi tidak stabil dan akan mudah bereaksi dengan molekul lain membentuk radikal baru. Radikal bebas dapat dihasilkan dari metabolisme tubuh yang merupakan faktor internal. selain itu juga dihasilkan oleh faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat pemicu radikal dalam makanan dan polutan lainnya. Penyakit yang disebabkan radikal bebas bersifat kronis yaitu dibutuhkan waktu bertahun-tahun untuk penyakit tersebut menjadi nyata atau bersifat akumulatif. Contoh penyakit yang sering dihubungkan dengan radikal bebas adalah serangan jantung, kanker, katarak, dan menurunnya fungsi ginjal. radikal bebas yang berada dalam tubuh ataupun yang masuk ke dalam tubuh melalui lingkungan dengan kadar antioksidan dalam tubuh. Bila kadar radikal bebas melampaui kemampuan tubuh untuk mengelolanya maka akan timbul kondisi stress oksidatif (oxidative stress). Stress oksidatif ini lah yang menjadi penyebab utama penyakit stroke, jantung, tekanan darah tinggi, preeklamsia, kanker. Untuk mencegah penyakit kronis karena radikal bebas diperlukan antioksidan (Fakriah et al., 2019).

2.2.4 Antioksidan

Secara alami, tubuh manusia sudah memproduksi antioksidan untuk mengimbangi jumlah oksidan yang masuk kedalam tubuh namun dikarenakan jumlah oksidan yang masuk melebihi batas kemampuan yang bisa diterima oleh antioksidan alami tubuh maka diperlukan antioksidan lain yang berasal dari luar. Antioksidan yang berasal dari luar tubuh dapat diperoleh dalam bentuk sintetik maupun yang berasal dari bahan alam. Namun, penggunaan antioksidan sintetik dibatasi oleh aturan pemerintah karena penggunaan yang melebihi batas dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan bersifat karsinogenik sehingga dibutuhkan alternatif antioksidan lain yang aman untuk digunakan. Salah satu sumber potensial antioksidan alami adalah tumbuhan (Wulansari *et al.*, 2018).

Antioksidan diperlukan untuk mencegah stress oksidatif. Stress oksidatif adalah kondisi dimana adanya ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas (Werdhasari, 2014). Mekanisme antioksidan dalam tubuh yaitu dengan enzim *superoksidasasi dismutase* atau SOD akan mengubah radikal superoksida yang dihasilkan dari respirasi serta berasal dari lingkungan menjadi hydrogen peroksida (H_2O_2) yang masih bersifat reaktif. SOD terdapat di dalam sitosol dan mitokondria. Peroksida dikatalisis oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Katalase mampu menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai substrat elektron donor dan satu molekul H_2O_2 menjadi substrat elektron akseptor, sehingga 2 molekul H_2O_2 menjadi 2 H_2O dan O_2 (Werdhasari, 2014). Di dalam eritrosit dan jaringan lain, enzim glutathion peroksidase (GPx) mengkatalisis destruksi H_2O_2 dan lipid hidroperoksida dengan menggunakan glutathion tereduksi (GSH), melindungi lipid membran dan hemoglobin dari serangan oksidasi oleh H_2O_2 , sehingga mencegah terjadinya hemolisis yang disebabkan oleh serangan peroksida. GSH akan dioksidasi menjadi GS-SG. Agar GSH terus tersedia untuk membantu kerja enzim GPx, maka GS-SG ini harus direduksi lagi menjadi GSH. Fungsi ini diperankan oleh enzim glutathion reduktase (GRed) (Werdhasari, 2014).

Mekanisme pertahanan terhadap oksidan terbagi dalam 3 jenis yaitu primer, sekunder, dan tersier.

- a. Mekanisme pertahanan primer bekerja melalui prinsip netralisir radikal bebas yaitu dengan memberikan satu elektron kepada molekul yang reaktif. Contoh antioksidan ini adalah tokoferol, asam askorbat, dan flavonoid.
- b. Mekanisme pertahanan sekunder bekerja dengan cara mengikat logam dan menyingkirkan logam transisi yang dapat memicu radikal bebas. Contoh antioksidan ini adalah albumin, dan transferrin.
- c. Mekanisme pertahanan tersier bekerja dengan mencegah penumpukan biomolekul agar tidak menimbulkan kerusakan lebih lanjut. Contohnya seperti perbaikan DNA yang rusak oleh enzim metionin reduktase dan protein teroksidasi oleh enzim proteolitik (Wulansari *et al.*,2018).

2.2.5 Metode Antioksidan

Metode antioksidan ada 2 yaitu :

- a. Metode In vitro

Metode in vitro meliputi :

- 1) DPPH

DPPH (2,2 difenil-1- pikrihidrazil) merupakan suatu senyawa radikal yang bersifat stabil. DPPH digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan melalui kemampuannya dalam menangkap radikal bebas. Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan transfer elektron yang dilakukan oleh antioksidan. Semula DPPH yang berwarna ungu pekat memberikan serapan pada panjang gelombang 517 nm namun setelah mengalami reduksi maka DPPH akan berubah menjadi senyawa difenil pikril hidrazin yang warnanya akan berangsur-angsur memudar menjadi warna kuning dan nilai serapannya akan sebanding dengan jumlah elektron yang diterima (Wulansari *et al.*,2018).

2) ABTS

ABTS (2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6- sulfonic acid) yang merupakan senyawa radikal yang mengandung atom nitrogen. Prinsip pengujian adalah penyetabilan radikal bebas melalui donor proton. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan penghilangan warna ABTS yang semula berwarna biru hijau akan berubah menjadi tidak berwarna apabila tereduksi oleh radikal bebas. Intensitas warna yang terbentuk kemudian diukur menggunakan spektrofotometri visible pada panjang gelombang 734 (Wulansari *et al.*, 2019).

3) CUPRAC

CUPRAC (*Cupric Reducing antioxidant*) adalah pengujian berbasis ET yang digunakan secara luas dan populer metode untuk menentukan pemulungan lengkap radikal bebas, yaitu total kapasitas antioksidan suatu senyawa. Metode ini didasarkan pada yang sederhana reaksi redoks antara antioksidan dan radikal bebas, dimana aktivitas antioksidan dapat diukur dengan mereduksi ion cupric menjadi ion cuprous oleh antioksidan. Metode antioksidan *in vitro* baru yang didasarkan pada transfer electron. Metode CUPRAC ini sangat luas digunakan untuk mengukur uji kapasitas antioksidan dalam makanan, tumbuhan, manusia, serum, sampel biologis, polifenol makanan, vitamin C dan E, dll (Dontha, 2016).

4) FIC

Metode FIC (*Ferrous Ion Chelating*) mengukur kemampuan suatu senyawa antioksidan bersaing dengan ferrozine dalam membentuk kelat dengan ion besi . Ekstrak yang memiliki kemampuan chelating logam akan mampu menangkap ion besi sebelum pembentukan kompleks $Fe(ferrozine)_3$ (Dewi *et al.*, 2014).

5) FRAP

Uji FRAP (*Ferric ion reducing antioxidant power*) adalah metode pengukuran langsung yang relatif sederhana, cepat, dan murah aktivitas antioksidan gabungan ("total") dari antioksidan reduktif

(mendonasikan elektron) dalam sampel uji. Pengujian menggunakan reduksi ion besi (Fe^{3+}) untuk ion besi (Fe^{2+}) sebagai sinyal, atau indikator, reaksi, dan ini terkait dengan perubahan warna. Berbagai jenis sampel dapat diuji dalam pengujian FRAP, dan dapat digunakan dengan sukses. Antioksidan yang bereaksi dalam uji FRAP adalah yang dapat mereduksi, di bawah reaksi kondisi yang digunakan, garam Fe^{3+} -TPTZ menjadi bentuk Fe^{2+} -TPTZ berwarna biru. Ini termasuk asam askorbat (vitamin C), α - tokoferol (vitamin E), asam urat, bilirubin, dan polifenol senyawa seperti katekin dan flavonoid lain dalam makanan nabati (Dontha, 2016).

b. Metode In vivo

Untuk semua metode in vivo, sampel yang akan diuji biasanya diberikan kepada hewan uji (tikus, tikus, dll.) dengan dosis tertentu regimen seperti yang dijelaskan dengan metode masing-masing. Setelah jangka waktu tertentu waktu, hewan biasanya dikorbankan dan darah atau jaringan digunakan untuk pengujian.

Metode in vivo meliputi :

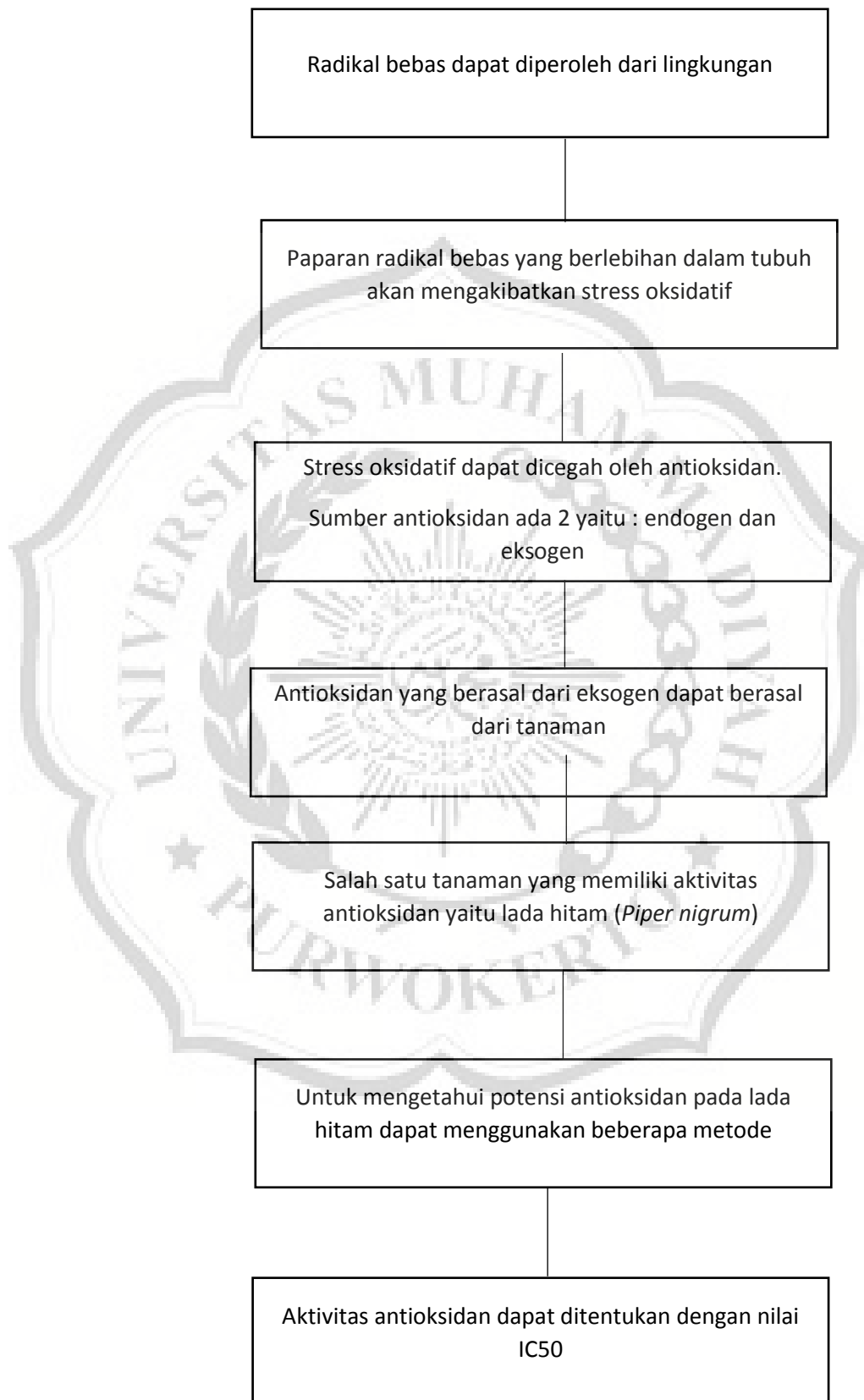
1) SOD

Dibantu dengan tembaga, seng, mangan dan besi, SOD terurai superoksida (yang berperan besar dalam peroksidasi lipid) menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. SOD hadir di hampir semua sel aerobik dan cairan ekstraseluler (Dontha, 2016).

2) CAT

Mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (menggunakan besi dan kofaktor mangan, sehingga menyelesaikan proses detoksifikasi SOD itu dimulai (Dontha, 2016).

2.3 Kerangka konsep



2.4 Hipotesis

Lada hitam diprediksi memiliki aktivitas antioksidan.

