

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Hasil Penelitian Terdahulu

Pada penelitian sebelumnya pernah dilakukan penelitian tentang uji aktivitas peredaman radikal bebas daun *Vasconcellea pubescens* A. DC. oleh Relani (2016) dan hasil yang diperoleh menunjukkan nilai IC_{50} sebesar 33,21 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian Indranila dan Ulfah (2015), diperoleh hasil penelitian tentang uji aktivitas antioksidan pada daun *V. pubescens* A. DC. berupa nilai IC_{50} sebesar 30,8 $\mu\text{g/mL}$, dan pada penelitian Laily *et al.* (2012), terhadap buah *V. pubescens* A. DC. diperoleh nilai IC_{50} sebesar 9,83 $\mu\text{g/mL}$. Pada penelitian Sambiri (2016), diperoleh hasil penelitian tentang uji aktivitas antioksidan pada biji pepaya (*Carica papaya* L.) diperoleh nilai IC_{50} sebesar 462,7 $\mu\text{g/mL}$.

B. Landasan Teori

1. Pepaya Gunung (*Vasconcellea pubescens* A. DC.)



Gambar 2.1. Buah pepaya gunung (*Vasconcellea pubescens* A. DC.)
(Sumber: Minarno, 2015)

a. Klasifikasi *Vasconcellea pubescens* A. DC.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dillenidae
Ordo	: Violales
Familia	: Caricaceae
Genus	: Vasconcellea
Spesies	: <i>Vasconcellea pubescens</i> A. DC.

(Bermejo J. Hernandez and Leon, 1994)

b. Nama Daerah

Di Indonesia *Carica pubescens* Lenne & K. Koch hanya dapat tumbuh di dataran tinggi dan dikenal dengan sebutan pepaya gunung atau pepaya mini. Di dataran tinggi Dieng, tanaman ini dikenal dengan tiga nama, yaitu kates, gandul, dan karika (Laily *et al.*, 2012).

c. Deskripsi Morfologi

Pepaya gunung merupakan pohon kecil yang tidak berkayu, mirip dengan *C. papaya* tetapi mempunyai cabang yang lebih banyak dan ukuran semua bagian tanaman lebih kecil. Tinggi rata-rata adalah 1-2 meter, buahnya berbentuk bulat telur dengan ukuran panjang 6-10 cm dan diameter 3-4 cm. Buah yang belum matang memiliki kulit yang berwarna hijau gelap dan akan berubah menjadi kuning setelah matang. Biji berwarna hitam dengan jumlah yang banyak dan padat (Laily *et al.*, 2012).

2. Antioksidan

Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (*electron donor*). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat dihambat. Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi (Sayuti dan Yenrina, 2015).

Damayanthi *et al.* (2010) menyatakan bahwa antioksidan dapat menghambat aktivitas oksidan dan dengan kandungan antioksidan yang cukup dapat membantu meningkatkan pertahanan tubuh terhadap timbulnya penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas. Namun,

apabila dikonsumsi berlebihan justru dapat menimbulkan penyakit karena dapat menyebabkan penimbunan lemak. Antioksidan juga berfungsi untuk melindungi sel dari pengaruh radikal bebas yang reaktif, radikal bebas dapat berasal dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal lainnya (Halliwell, 2012).

Antioksidan memiliki dua fungsi. Fungsi pertama adalah sebagai pemberi atom hidrogen, senyawa ini dapat memberi atom hidrogen secara cepat pada radikal lipida ($R\bullet$, $ROO\bullet$) atau mengubahnya menjadi bentuk yang stabil, sementara turunan radikal antioksidan ($A\bullet$) memiliki keadaan yang lebih stabil dibandingkan radikal lipid. Fungsi yang kedua adalah memperlambat laju reaksi, mengubah radikal lipida ($R\bullet$, $ROO\bullet$) menjadi bentuk stabil.

Perubahan antioksidan (AH) dengan konsentrasi yang rendah pada lipid dapat menghambat atau mencegah reaksi autooksidasi lipid pada tahap inisiasi dan propagasi. Radikal antioksidan ($A\bullet$) yang terbentuk pada reaksi tersebut relatif stabil dan tidak cukup energi untuk dapat bereaksi dengan molekul lipid lain membentuk radikal lipid baru (Inggrid and Santoso, 2016).

Reaksi penghambatan antioksidan terhadap radikal lipida adalah sebagai berikut (Inggrid dan Santoso, 2016):



Tanpa adanya antioksidan reaksi oksidasi lipid akan berlanjut ke tahap terminasi.

3. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Menurut Molyneux (2004), radikal bebas adalah atom, molekul, atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mempunyai elektron tidak berpasangan, oleh karena itu bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Elektron yang tidak berpasangan selalu

berusaha untuk mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain.

Radikal bebas dalam jumlah normal bermanfaat bagi kesehatan misalnya, memerangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos pembuluh darah serta organ-organ dalam. Dalam jumlah berlebih mengakibatkan stress oksidatif. Keadaan ini dapat menyebabkan kerusakan oksidatif mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga ke prgan tubuh. Oksigen reaktif dapat merugikan molekul dalam sel, sehingga dapat menghancurkan membran sel, asam nukleat dan protein. Peristiwa ini dapat mempercepat terjadinya proses penuaan dan munculnya penyakit lain seperti penyakit jantung dan kanker (Mardawati *et al.* , 2008).

Menurut Sayuti dan Yenrina (2015), tahap-tahap pembentukan radikal bebas adalah sebagai berikut:

a. Tahap inisiasi

Tahap inisiasi merupakan awal pembentukan radikal bebas. Pada tahap ini radikal bebas mulai terbentuk yang diproduksi oleh beberapa proses seperti pemanasan atau perubahan intensitas cahaya.



Pada tahap inisiasi asam lemak (RH) bereaksi dengan oksigen triplet, dan membentuk radikal lemak (R*) dan radikal peroksida (HOO*) dengan inisiator cahaya atau panas.

b. Tahap propagasi

Tahap propagasi merupakan awal pemanjangan rantai radikal atau reaksi, dimana radikal-radikal bebas akan diubah menjadi radikal-radikal yang lain.



c. Tahap terminasi

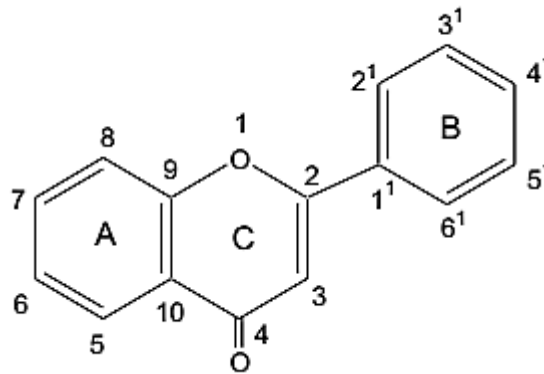
Tahap terminasi merupakan tahap dimana senyawa radikal akan bereaksi dengan radikal lain atau penangkap radikal, sehingga propagasinya rendah.



Pada tahap terminasi akan terbentuk spesies non radikal karena radikal bebas yang bereaksi satu sama lain.

4. Flavonoid

Flavonoid merupakan suatu senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzene yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai lurus yang terdiri dari tiga atom karbon. Kerangka ini ditunjukkan dalam sistem $C_6 - C_3 - C_6$ (Markham, 1988). Penggolongan flavonoid berdasarkan substituen cincin heterostik yang mengandung oksigen dan perbedaan distribusi dari gugus hidroksil. Perbedaan oksidasi di bagian atom C_3 menentukan sifat, khasiat, dan golongan atau tipe flavonoid (Markham, 1988). Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur, semuanya mengandung 15 atom karbon dalam 6 inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi $C_6 - C_3 - C_6$, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak dapat membentuk cincin ketiga. Cincin diberi tanda A, B, C, atom karbon dinomori menurut sistem penomoran dengan menggunakan angka biasa untuk cincin A dan C, serta angka "beraksen" untuk cincin B (Markham, 1988). Kerangka dasar flavonoid dan cara penomorannya terdapat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2. Kerangka dasar flavonoid
(Sumber: Markham, 1988)

5. Ekstrak dan Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental atau cair yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani dengan menggunakan pelarut yang sesuai kemudian semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes RI, 2000).

Ekstraksi merupakan suatu cara untuk mengambil atau menarik komponen kimia yang terkandung dalam sampel menggunakan pelarut yang sesuai (Depkes RI, 2000).

a. Metode Ekstraksi

Menurut Depkes RI (2000), ada beberapa metode ekstraksi diantaranya:

1) Cara Dingin

a) Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukkan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukkan secara kontinu (terus menerus). Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut.

b) Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan.

2) **Cara Panas**

a) Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin yang baik.

b) Soxhlet

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relative konstan dengan adanya pendingin balik.

c) Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.

d) Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C selama waktu tertentu (15-20 menit).

e) Dekokta

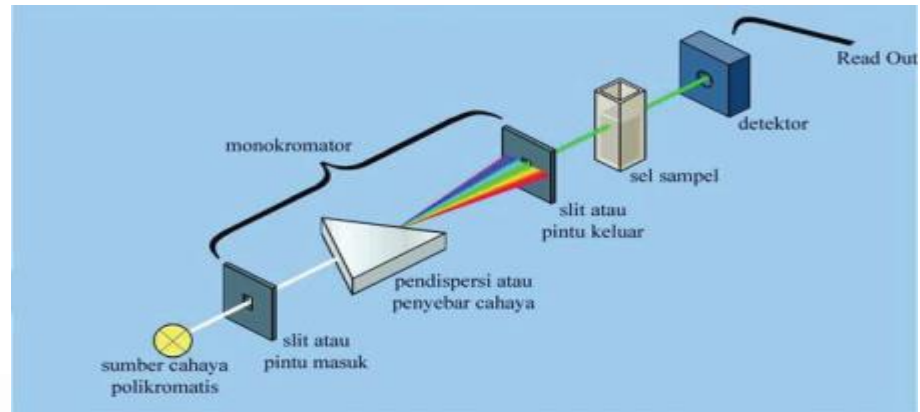
Dekokta adalah infus pada waktu yang lebih lama dan temperatur sampai titik didih air dengan waktu 30 menit.

6. Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer digunakan untuk mengukur energi secara relatif jika energi tersebut ditransmisikan, direfleksikan, atau diemisikan sebagai fungsi dari panjang gelombang (Suharti, 2013).

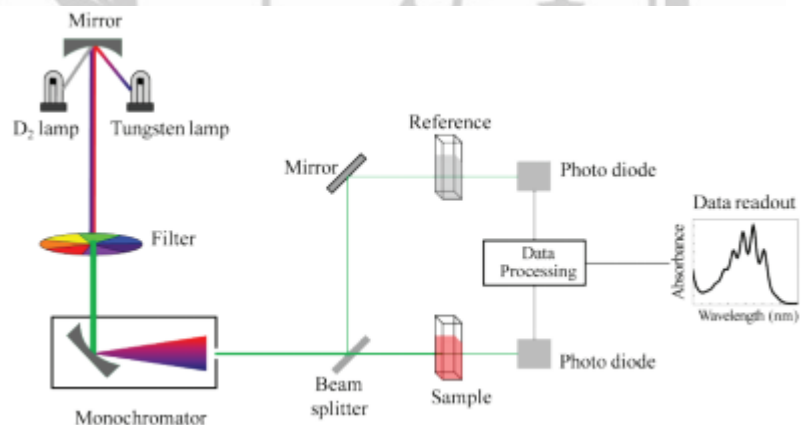
Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radikal elektromagnetik (REM) dengan molekul. Radiasi REM merupakan bentuk radiasi yang mempunyai sifat gelombang dan partikel. Spektrum UV-Vis mempunyai bentuk yang lebar dan hanya sedikit informasi tentang struktur yang bisa didapatkan dari spektrum ini. tetapi spektrum ini sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit didalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Suharti, 2013).

Pada umumnya terdapat dua tipe instrumen spektrofotometer, yaitu *single-beam* dan *double beam*. *Single-beam instrument* (Gambar 2.3), dapat digunakan untuk kuantitatif dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tunggal, *Single-beam instrument* mempunyai beberapa keuntungan yaitu sederhana, dan harganya murah. Panjang gelombang paling rendah adalah 190 sampai 210 nm dan paling tinggi adalah 800-1000 nm. *Double-beam instrument* (Gambar 2.4) mempunyai dua sinar yang dibentuk oleh potongan cermin yang berbentuk V yang disebut pemecah sinar. Sinar pertama melewati larutan blanko dan sinar kedua secara serentak melewati sampel (Suharti,2013).



Gambar 2.3. Diagram alat spektrofotometer UV-Vis (*single-beam*)
(Sumber: Suharti, 2013)

Sumber sinar polikromatis, untuk sinar UV adalah lampu deuterium, sedangkan sinar visibel atau sinar tampak adalah lampu wolfram. Monokromator pada spektrofotometer UV-Vis digunakan lensa prisma dan filter optik. Sel sampel berupa kuvet yang terbuat dari kuarsa atau gelas dengan lebar yang bervariasi. Detektor berupa detektor foto atau detektor panas atau detektor dioda foto, berfungsi menangkap cahaya yang diteruskan dari sampel dan mengubahnya menjadi arus listrik (Suharti, 2013). Diagram spektrofotometer UV-Vis (*Double-beam*) dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4. Diagram alat spektrofotometer UV-Vis (*double-beam*)
(Sumber: Suharti, 2013)

7. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) tergolong "kromatografi planar." KLT adalah metode kromatografi paling sederhana yang banyak digunakan. Peralatan dan bahan yang dibutuhkan untuk melaksanakan pemisahan dan analisis sampel dengan metode KLT cukup sederhana yaitu sebuah bejana tertutup (*chamber*) yang berisi pelarut dan lempeng KLT. Dengan optimasi metode dan menggunakan instrumen komersial yang tersedia, pemisahan yang efisien dan kuantifikasi yang akurat dapat dicapai. Kromatografi planar juga dapat digunakan untuk pemisahan skala preparatif yaitu dengan menggunakan lempeng, peralatan, dan teknik khusus (Wulandari dan Lesty, 2016).

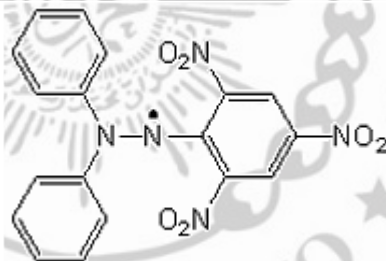
Pelaksanaan analisis dengan KLT diawali dengan menotolkan alikuot kecil sampel pada salah satu ujung fase diam (lempeng KLT), untuk membentuk zona awal. Kemudian sampel dikeringkan. Ujung fase diam yang terdapat zona awal dicelupkan ke dalam fase gerak (pelarut tunggal ataupun campuran dua sampai empat pelarut murni) di dalam *chamber*. Jika fase diam dan fase gerak dipilih dengan benar, campuran komponen-komponen sampel bermigrasi dengan kecepatan yang berbeda selama pergerakan fase gerak melalui fase diam. Hal ini disebut dengan pengembangan kromatogram. Ketika fase gerak telah bergerak sampai jarak yang diinginkan, fase diam diambil, fase gerak yang terjebak dalam lempeng dikeringkan, dan zona yang dihasilkan dideteksi secara langsung (visual) atau di bawah sinar ultraviolet (UV) baik dengan atau tanpa penambahan pereaksi penampak noda yang cocok.

Perbedaan migrasi merupakan hasil dari perbedaan tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Berbagai mekanisme pemisahan terlibat dalam penentuan kecepatan migrasi. Kecepatan migrasi komponen sampel tergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi juga ditentukan oleh interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer

karge), ikatan ion-ion, ikatan ion dipol, dan ikatan van der Waals (Wulandari dan Lesty, 2016).

8. Uji Aktivitas Antioksidan

Metode yang paling sering digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan tanaman obat adalah metode uji dengan menggunakan radikal bebas DPPH. Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH adalah metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain (Sayuti dan Yenrina, 2015). Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasarkan pada jenis radikal yang dihambat (Ahmar *et al.*, 2018). DPPH merupakan radikal bebas yang umum digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam.



Gambar 2.5. Rumus bangun DPPH
(Sumber: Molyneux, 2004)

Antioksidan dapat bereaksi dengan radikal DPPH sehingga akan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning, kemudian diukur pada panjang gelombang 515-520 nm. Radikal bebas DPPH memiliki elektron tidak berpasangan, warna ungu akan berubah menjadi kuning saat radikal DPPH berpasangan dengan atom hidrogen dari antioksidan membentuk DPPH-H (Molyneux, 2004).

