

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn)



Sumber : deskjabar.pikiran-rakyat.com

Gambar 2. 1. Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn)

Belimbing Wuluh atau yang biasa kita kenal dengan nama belimbing sayur adalah suatu tumbuhan yang dapat hidup pada ketinggian 5 – 500 meter di atas permukaan laut. Tumbuhan Belimbing Wuluh ini merupakan salah satu jenis tumbuhan tropis yang artinya dapat berbuah sepanjang tahun bukan tumbuhan musiman. Tumbuhan ini dapat tumbuh mencapai ketinggian 5 – 10 meter dengan memiliki batang utama yang pendek, cabang yang terletak rendah, batang yang bergelombang dan berdiameter dengan ukuran sekitar 30 cm (Rahayu, 2013).

Tanaman belimbing wuluh mudah untuk dikembang biakkan melalui proses pencangkakan atau proses persemaian biji. Apabila proses perkembangbiakan yang digunakan adalah dengan menggunakan biji, tanaman dapat berbuah apabila telah memasuki usia 3 – 4 tahun dan dapat berbuah hingga mencapai jumlah 1.500 buah per tahunnya (Mario, 2011).

Buah belimbing wuluh dikenal sebagai belimbing asam karena rasanya yang cukup asam dan sering digunakan dalam masakan maupun jamu. Tumbuhan Belimbing Wuluh ini mempunyai nama ilmiah sebagai *Averrhoa bilimbi* Linn (Gendrowati, 2015). Belimbing Wuluh diketahui berasal dari Malaysia, dan kini telah menyebar ke seluruh bagian negara Indonesia.

Tumbuhan ini biasanya ditanam di pekarangan maupun tumbuh secara liar. Tumbuhan Belimbing Wuluh ini diketahui dapat tumbuh subur di negara beriklim tropis yakni Indonesia, Filipina, Malaysia, Sri Lanka, dan Myanmar (Rahayu, 2013).

2.1.1. Taksonomi

Belimbing wuluh memiliki sistematika taksonomi yaitu sebagai berikut :

Tabel 2. 1. Kedudukan Taksonomi Tanaman Belimbing Wuluh

Kingdom	:	Plantae
Subkingdom	:	Tracheobionta
Superdivisio	:	Spermatophyta
Divisio	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Sub-kelas	:	Rosidae
Ordo	:	Geraniales
Familia	:	Oxalidaceae
Genus	:	<i>Averrhoa</i>
Spesies	:	<i>Averrhoa bilimbi</i> Linn

(Sumber : Dasuki, 1991)

2.1.2. Manfaat

Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) dimanfaatkan untuk dibuat sebagai manisan dan sirup, obat untuk mengobati berbagai penyakit seperti sariawan, sakit perut, batuk, gusi berdarah, sakit gigi, maupun masalah pencernaan. Selain itu, buah Belimbing Wuluh juga sering dimanfaatkan dalam campuran sabun sebagai agen penghilang noda kain, menetralkan bau amis, mengkilapkan barang yang terbuat dari kuningan (Rahayu, 2013).

Buah, batang, bunga maupun daun dari Belimbing Wuluh juga banyak dimanfaatkan untuk menyembuhkan penyakit yaitu penyakit gondongan, rematik, batuk rejan, serta pengobatan pada jerawat dan panu (Herbie, 2015). Buah Belimbing Wuluh juga diketahui memiliki efek untuk menghilangkan sakit (analgetik), antiradang, peluruh kecing, astringent, serta dapat memperbanyak dalam pengeluaran empedu (Putra, 2015).

2.1.3. Kandungan Gizi

Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) memiliki banyak kandungan gizi. Kandungan vitamin yang terdapat pada buah Belimbing Wuluh per 100 gram adalah sebagai berikut :

Tabel 2. 2. Kandungan Vitamin dalam 100 gram buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*)

Vitamin	Jumlah (mg)
Riboflavin	: 0,026
Tiamin	: 0,010
Niacin	: 0,302
Asam Askorbat	: 15,6
Karoten	: 0,035
Vitamin A	: 0,036

(Sumber : Roy et al., 2011)

Selain itu, buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) juga mengandung beberapa mineral yang penting bagi tubuh, yakni sebagai berikut :

Tabel 2. 3. Kandungan Mineral dalam 100 gram buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*)

Mineral	Jumlah (mg)
Fosfor	: 11,1
Kalsium	: 3,5
Besi	: 1

(Sumber : Roy et al., 2011)

2.1.4. Kandungan Kimia

Karena rasanya yang sangat masam, dapat dipastikan bahwa buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi Linn*) mengandung banyak vitamin C atau asam askorbat. Selain itu, buah dari Belimbing Wuluh juga banyak mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, terpenoid, asam format, peroksida, dan glukosida sulfur yang dapat dijadikan sebagai zat anti mikroba (Gendrowati, 2015; Rahmiati et al., 2017).

Melalui pemeriksaan kimia yang telah dilakukan diketahui bahwa buah Belimbing Wuluh (*Averrho bilimbi Linn*) juga mengandung golongan senyawa oksalat, minyak yang mudah menguap, kalium, fenol, flavonoid, serta pektin (Rahayu, 2013; Sutrisna & Sujono, 2015).

2.2. *Infused Water*

Air merupakan komponen utama yang sangat penting bagi kehidupan. Karena itu, manusia dan makhluk hidup tidak dapat dipisahkan dari keberadaan air. Air sangat dibutuhkan bagi makhluk hidup untuk bertahan hidup. Air digunakan untuk memenuhi kebutuhan hidrasi bagi makhluk hidup. Apabila tubuh kekurangan cairan akan menyebabkan terjadinya dehidrasi yang akan berakibat pada menurunnya fungsi tubuh (Susanti *et al.*, 2010).

Kegunaan air bagi tubuh manusia adalah berhubungan dengan proses metabolisme dalam tubuh, pengangkutan zat-zat makanan dalam tubuh, pengaturan keseimbangan cairan dan pH tubuh, serta untuk menjaga proses pencernaan. Konsumsi air disarankan minimal 2,5 liter untuk orang dewasa atau sekitar 8 gelas per hari. Selain itu, juga direkomendasikan untuk mandi setidaknya 2 kali menggunakan air bersih agar tubuh tetap bersih dan terhindar dari kuman-kuman penyebab penyakit (Asmadi *et al.*, 2011).

Infused water berasal dari kata “infuse” yang memiliki arti “memasukkan” dan “water” yang memiliki arti “air”. Sehingga, *infused water* merupakan suatu produk yang diperoleh dengan cara memasukkan nutrisi dalam air. Nutrisi yang dimaksud ialah berupa buah maupun herbal yang memiliki rasa dan warna sehingga dapat memberikan kesegaran dan rasa yang lebih baik daripada mengonsumsi air putih secara biasa (Puspaningtyas & Prasetyaningrum, 2014).

Infused water dibuat dengan cara memasukkan buah atau sayur yang telah dirajang tipis ke dalam air untuk kemudian dimasukkan ke dalam *refrigerator* selama kurang lebih waktu 30 menit hingga 12 jam, dan untuk beberapa buah dapat diisi ulang selama waktu 24 jam. Tidak ada penambahan gula atau pemanis lainnya. Mekanisme *infused water* yaitu diakibatkan karena adanya proses osmosis atau perpindahan molekul melalui membran semi permeabel dari konsentrasi rendah menuju ke konsentrasi tinggi (Akhmad & Dewi, 2014).

Hal yang mempengaruhi kualitas *infused water* adalah karakteristik kimia yakni aktivitas antioksidan, kadar vitamin C, pH, total fenol, kadar gula, dan sensoris yang terdapat di dalamnya. Kandungan dalam buah atau sayur yang berbeda inilah yang berpengaruh terhadap proses ekstraksi senyawa yang larut

air selama proses perendaman dan pendiaman *infused water* (Harifah *et al.*, 2017).

2.2.1. Manfaat *Infused Water*

Infused water dapat dijadikan alternatif dalam membantu kebiasaan lebih banyak mengonsumsi air pada anak-anak dan remaja, dapat menciptakan berbagai rasa atau aroma dari campuran buah atau sayur yang diinginkan, mendapatkan zat gizi dan vitamin dari buah dan herbal, membantu proses detoksifikasi, dan juga dapat digunakan untuk upaya pengurangan berat badan (Soraya, 2014). Bahkan, beberapa ahli gizi memperkirakan bahwa kandungan vitamin yang keluar saat perendaman yaitu sebesar 20% dari kandungan jus buah yang segar dengan catatan tanpa ekstra kalori atau tambahan fruktosa dan pemanis lainnya (Haribowo, 2014; Mustafa *et al.*, 2015).

2.3. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia atau uji fitokimia merupakan uji kualitatif awal yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam suatu sampel yang akan diteliti (Syhadat dan Siregar, 2020). Skrining fitokimia ini merupakan langkah awal yang sangat penting sifatnya karena dapat digunakan sebagai gambaran dalam mengetahui potensi dari sumber daya tumbuhan obat yaitu salah satu contohnya sebagai antibiotik, antioksidan, dan juga anti kanker (Astuti *et al.*, 2013).

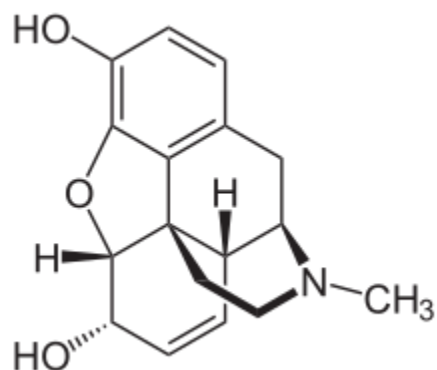
2.3.1. Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit primer adalah suatu senyawa yang langsung terlibat dalam proses pertumbuhan suatu tumbuhan. Sedangkan, metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan dalam suatu jalur metabolisme lain. Metabolit sekunder terkadang dianggap penting namun juga tidak penting dalam beberapa situasi terhadap pertumbuhan suatu tumbuhan. Metabolit sekunder berperan pada pertumbuhan suatu tumbuhan, namun dalam jangka panjang sehingga tidak terlalu dapat dilihat untuk signifikansi perubahan yang dialami (Julianto, 2019).

Metabolit sekunder dimanfaatkan dalam hal untuk hal pertahanan suatu tumbuhan dan juga untuk memberikan karakteristik yang khas warna dalam tumbuhan tertentu. Metabolisme sekunder digunakan sebagai pengatur aktivitas metabolisme sel dan juga sebagai penanda dan pengatur jalur metabolisme primer. Senyawa metabolit sekunder yang terkenal dan telah diketahui banyak orang yaitu senyawa alkaloid, polifenol termasuk flavonoid, saponin, dan terpenoid. Senyawa tersebut banyak digunakan manusia untuk tujuan pengobatan dan nutrisi terhadap masalah kesehatan tertentu (Julianto, 2019).

2.3.2. Senyawa Alkaloid

Alkaloid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang berada dalam jaringan tumbuhan dan hewan dan telah banyak ditemukan. Sebagian besar alkaloid dapat ditemukan dari tumbuhan yang tersebar luas dan berasal dari tumbuhan tingkat tinggi. Dari seluruh spesies angiospermae, 20% nya mengandung senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid termasuk ke dalam senyawa bebas dan bersifat basa organik yang didalamnya dapat mengandung satu atau bahkan lebih atom nitrogen. Alkaloid dapat larut dalam suatu pelarut organik, salah satunya kloroform, sedangkan dalam bentuk garam organiknya dapat larut dalam air garam (Ningrum *et al.*, 2016).



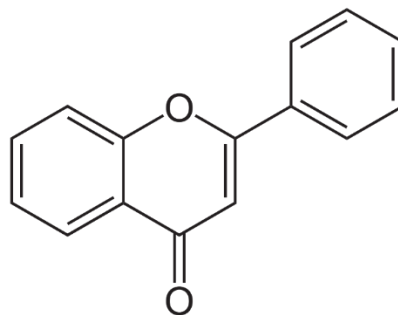
Sumber : [id.wikipedia.id](https://id.wikipedia.org)

Gambar 2. 2 Struktur Molekul Senyawa Alkaloid

Senyawa alkaloid mengandung unsur nitrogen sebagai penyusun dari sistem sikliknya, selain itu alkaloid juga mengandung suatu substituen atau gugus fungsi yang cukup bervariasi seperti gugus amina, fenol, amida, dan metoksi. Sehingga, senyawa alkaloid dapat dikatakan bersifat semipolar (Dewi *et al.*, 2013).

2.3.3. Senyawa Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemui pada tumbuhan. Flavonoid telah banyak menjadi subjek penelitian dan telah dilaporkan dapat digunakan untuk mencegah atau menunda beberapa penyakit kronis dan penyakit degeneratif contohnya adalah penyakit kanker, penyakit kardiovaskular, penyakit artritis, penyakit katarak, amnesia, penyakit stroke, penyakit alzheimer, radang, infeksi, dan proses penuaan dini. Flavonoid bekerja dengan cara menekan pembentukan spesies oksigen reaktif dan melindungi zat antioksidan dalam tubuh (Kumar dan Pandey, 2013).



Sumber : id.wikipedia.id

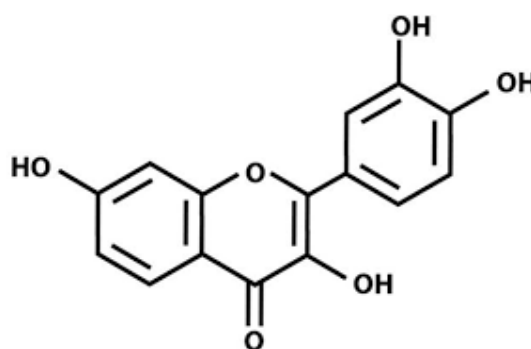
Gambar 2. 3 Struktur Molekul Senyawa Flavonoid

Flavonoid mempunyai struktur benzo – γ – pyrone. Faktor penyusun struktur molekul flavonoid yaitu atom karbon yang berjumlah 15. Flavonoid terdiri dari 2 (dua) cincin benzena (A dan B) yang dihubungkan oleh cincin *pyrone* heterosiklik (C). Flavonoid dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelas yakni seperti flavon (flavon, luteolin, dan apigenin), flavonol (kaempferol, quercetin, fisetin, dan mirisetin), flavanon (flavanon,

naringenin, dan hesperetin), dan golongan flavonoid lainnya (Kumar dan Pandey, 2013).

2.3.4. Senyawa Tanin

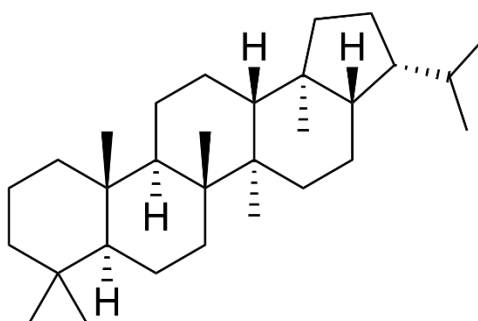
Tanin adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat di tanaman dan disintesis dari bagian tanaman. Tanin memiliki berat molekul sebesar 500 hingga 3000. Senyawa tanin mengandung gugus hidroksi fenolik yang akan memungkinkan membentuk ikatan silang yang efektif dengan senyawa protein yang ada (Hidayah, 2016).



Sumber : *e-journal-uajy.ac.id*

Gambar 2. 4 Struktur Molekul Senyawa Tanin

2.3.5. Senyawa Triterpenoid



Sumber : *id.wikipedia.id*

Gambar 2. 5 Struktur Molekul Senyawa Steroid

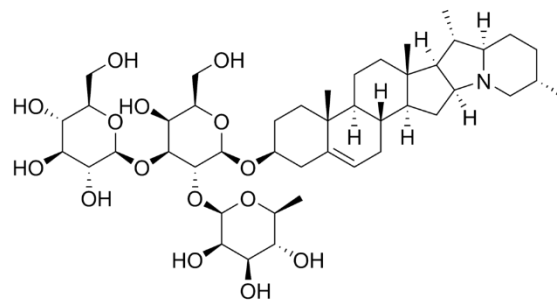
Senyawa steroid atau triterpenoid merupakan senyawa yang secara alami terdapat dalam tubuh, maupun ditemukan pada tumbuhan dan hewan. Fungsi dari steroid adalah berperan dalam proses regulasi metabolisme dalam tubuh yaitu contohnya metabolisme energi, metabolisme air dan

keseimbangan natrium dalam tubuh, fungsi kognitif, dan fungsi reproduksi. Senyawa steroid dapat disintesis dalam jumlah yang besar dilakukan secara struktural yang mempunyai target spesifik dalam melawan beberapa penyakit. Steroid digunakan dalam pengobatan penyakit seperti penyakit kanker, penyakit gangguan hati, penyakit kardiovaskular, radang, infeksi, dan penyakit lainnya yang erat hubungannya dengan hormon steroid (Bhawani *et al.*, 2011).

Senyawa steroid atau terpenoid bermanfaat dalam merangsang pembentukan lemak dan protein yang sangat bermanfaat bagi kesehatan kulit kita. Senyawa steroid dapat mengubah senyawa alanin dan prolin menjadi suatu kolagen yang fungsinya adalah untuk merawat kulit. Selain itu, steroid dapat digunakan dalam pengobatan yaitu dengan cara mempercepat pertumbuhan luka pasca-operasi, flek hitam, dan jerawat pada kulit (Sutardi, 2016).

2.3.6. Senyawa Saponin

Saponin termasuk ke dalam senyawa metabolit sekunder yang biasanya ditemukan dan dihasilkan dari spesies tumbuhan tingkat tinggi. Saponin ditemukan pada bagian tertentu pada tumbuhan yang jumlahnya sangat dipengaruhi oleh varietas tumbuhan. Saponin termasuk dalam golongan senyawa permukaan yang kuat dan dapat menimbulkan busa apabila dilakukan pengocokan dalam air aktif dan dapat bersifat seperti sabun. Senyawa saponin dapat larut dalam air dan alkohol (Illing *et al.*, 2017). Kandungan saponin dalam tumbuhan yang berumur muda diketahui lebih banyak dibandingkan dengan tumbuhan yang telah berumur tua. Saponin juga diketahui memiliki kemampuan hemolitik (Purnamaningsih *et al.*, 2017).



Sumber : id.wikipedia.id

Gambar 2. 6 Struktur Molekul Senyawa Saponin

Senyawa saponin termasuk dalam golongan senyawa glikosida triterpen yang mempunyai sifat cenderung polar. Hal ini disebabkan karena ikatan glikosida yang terdapat dalam saponin (Sangi *et al.*, 2013).

2.4. Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat melindungi sel tubuh dari pengaruh radikal bebas (Winarsi, 2014). Antioksidan pada prinsipnya bekerja dengan cara mendonorkan elektronnya pada senyawa yang bersifat oksidan, melalui cara pengikatan atom oksigen dan pelepasan atom hidrogen. Proses oksidasi sangat penting bagi kelangsungan metabolisme dalam tubuh. Namun, apabila molekul yang dihasilkan dari proses oksidasi jumlahnya berlebihan maka dapat merusak kesehatan (Musarofah, 2015).

2.4.1. Radikal Bebas

Oksidasi merupakan suatu proses pengurangan elektron yang mengakibatkan terjadinya peningkatan muatan positif. Sebaliknya pula dalam suatu keseimbangan, disamping terjadi proses oksidasi pasti akan terjadi proses reduksi. Reduksi merupakan proses penambahan jumlah elektron dari substrat yang telah menerima elektron tersebut. Reaksi oksidasi terjadi setiap saat termasuk saat ketika kita bernafas dan melakukan proses metabolisme dalam tubuh. Reaksi inilah yang dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas (Yulianti, 2018).

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang dapat berdiri sendiri dengan mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Dengan adanya elektron yang tidak berpasangan ini, akan mengakibatkan

molekul ini mudah untuk tertarik pada suatu medan magnetik sehingga menyebabkan molekul ini bersifat sangat reaktif.. Radikal bebas dapat menyerang molekul yang stabil terdekat dan mengambil elektronnya. Zat yang diambil elektronnya akan berubah menjadi radikal bebas baru, sehingga akan mengakibatkan terjadinya reaksi berantai yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Elektron radikal bebas yang tidak berpasangan tidak dapat mempengaruhi muatan elektrik dari molekulnya, sehingga radikal bebas dapat bermuatan positif, negatif, atau netral (Yulianti, 2018).

Radikal bebas dalam jumlah yang normal dan tidak terlalu banyak akan sangat bermanfaat bagi kesehatan manusia, misalnya dapat mengurangi peradangan, membunuh bakteri, dan mengendalikan tonus otot polos dalam pembuluh darah serta organ-organ dalam tubuh. Sedangkan, apabila dalam jumlah yang berlebih, radikal bebas akan mengakibatkan stres oksidatif. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan oksidatif dalam tubuh mulai dari tingkat sel, jaringan, hingga mencapai organ tubuh yang dapat mempercepat terjadinya proses penuaan dan munculnya beberapa penyakit (Yulianti, 2018).

2.4.2. Klasifikasi Antioksidan

Antioksidan jika ditinjau dari sumbernya dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami dihasilkan dari proses ekstraksi bahan alam tumbuhan, sedangkan antioksidan sintetik berasal dari proses sintesis senyawa kimia (Bundit, 2016).

Antioksidan alami adalah senyawa antioksidan yang dihasilkan melalui proses alami, baik dihasilkan dari tubuh maupun dari ekstrak bahan alam yaitu seperti sayuran, buah, atau daun. Sedangkan antioksidan sintetik merupakan senyawa antioksidan yang diperoleh dari hasil reaksi kimia. Contohnya adalah butil hidroksi anisol (BHA, propil galat, terbutil hidrosi quinon (TBHQ), tokoferol, dan butil hidroksi toluen (BHT).

2.4.3. IC₅₀

Aktivitas antioksidan dalam suatu sampel dapat ditentukan dengan menggunakan acuan nilai IC₅₀. IC₅₀ atau merupakan kependekan dari

Inhibition Concentration 50% merupakan bilangan yang menyatakan besarnya nilai konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal bebas dengan persentase sebesar 50%. Nilai IC_{50} untuk masing-masing konsentrasi sampel dihitung dengan menggunakan rumus persamaan regresi linear, yang didalamnya menyatakan hubungan linear antara konsentrasi fraksi antioksidan yang dapat dinyatakan sebagai sumbu X dengan %inhibisi yang dinyatakan sebagai sumbu Y dari beberapa seri replikasi pengukuran yang telah dilakukan (Purwanto *et al.*, 2017).

Penggolongan sifat antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} yang telah didapatkan melalui pengujian dapat diuraikan sebagai berikut.

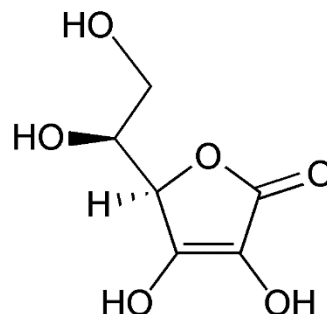
Tabel 2. 4 Penggolongan Sifat Antioksidan Berdasarkan Nilai IC_{50}

No.	Sifat Antioksidan	Nilai IC_{50} (ppm)
1.	Sangat Kuat	< 50
2.	Kuat	50 - 100
3.	Sedang	101 - 150
4.	Lemah	151 - 200
5.	Sangat Lemah	> 200

(Molyneux, 2004)

2.4.4. Asam Askorbat

Vitamin C merupakan salah satu vitamin yang dapat larut dalam air. Vitamin C ini sangat penting bagi kesehatan manusia karena dapat memberikan perlindungan terhadap zat antioksidan plasma lipid yang sangat berfungsi dalam menjaga kekebalan tubuh dan menekan replikasi virus dan produksi interferon (Mittesser *et al.*, 2016).



Sumber : [id.wikipedia.id](https://id.wikipedia.org)

Gambar 2. 7 Struktur Molekul Asam Askorbat

Asam askorbat memiliki rumus kimia $C_6H_8O_6$ dengan berat molekul 176,1 gram/mol, $pK_a = 4,2; 11,6$ (pada suhu $25^\circ C$), dan $\log P$ (oktanol ; air) = 1,8 (Moffat *et al*, 2011). Asam askorbat memiliki dua bentuk enansional yaitu *L-ascorbic acid* dan *D-ascorbic acid* (Nasheed & Qamar, 2015).

Asam askorbat atau yang kita kenal sebagai Vitamin C biasanya digunakan sebagai standar dalam pengujian antioksidan. Hal ini dikarenakan vitamin C memiliki kemampuan yaitu nilai aktivitas antioksidan yang tinggi dibandingkan dengan nilai aktivitas antioksidan dari vitamin A dan vitamin E yaitu sebesar $14,79 \mu g/mL$ (Lung & Dika, 2017).

2.5. Metode Pengujian Antioksidan

2.5.1. Klasifikasi Metode Pengujian Antioksidan

Menurut Pisoschi dan Negulescu (2011), dalam suatu analisis untuk menguji aktivitas antioksidan beserta kapasitas senyawa antioksidan dalam suatu ekstrak tumbuhan dapat digunakan salah satu dari beberapa metode. Metode tersebut diantaranya adalah sebagai berikut :

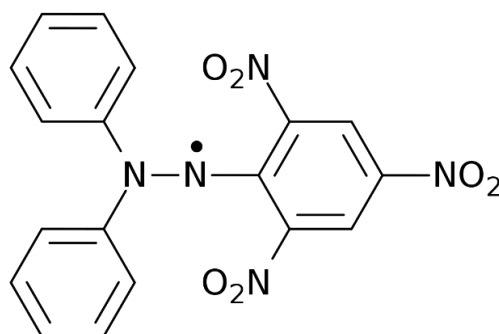
- a. Metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)
- b. Metode 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS)
- c. Metode Ferric Ion Reducing Antioxidant Parameter (FRAP)
- d. Metode Potassium Ferricyanide Reducing Antioxidant Parameter (PFRAP)
- e. Metode Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)
- f. Metode Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (HORAC)
- g. Metode Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)
- h. Metode Total Radical Trapping Antioxidant Capacity (TRAP)
- i. Metode Fluorimetri

2.5.2. Metode DPPH

Salah satu metode yang sering digunakan dalam analisis aktivitas senyawa antioksidan adalah metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Metode DPPH ini banyak digunakan karena memiliki beberapa

keunggulan dibandingkan dengan metode lainnya yaitu metode yang digunakan cukup sederhana, biaya yang dibutuhkan relatif rendah, tidak sulit untuk dioperasikan, dan dapat dilakukan menggunakan instrumen spektrofotometer. Metode ini telah banyak diaplikasikan dalam analisis untuk mengukur aktivitas antioksidan baik dalam sampel ekstrak tumbuhan, makanan, dan minuman (Pyrzynska, 2013).

Prinsip dari metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ini adalah dengan menggunakan metode spektrofotometri, yang didapatkan berupa persentase aktivitas penangkal radikal bebas yang diperoleh dari nilai absorbansi DPPH. Hasil absorbansi tersebut akan dibandingkan dengan senyawa antioksidan alami seperti vitamin C, vitamin E, atau kuersetin (Lu *et al.*, 2014).



Sumber : *en.wikipedia.org*

Gambar 2. 8 Stuktur Molekul DPPH

Molekul 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) mempunyai ciri khas unik yaitu merupakan salah satu jenis radikal bebas yang sifatnya stabil dari cadangan di atas molekulnya secara keseluruhan. Senyawa 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) adalah suatu senyawa radikal bebas yang cukup stabil dan dapat memberikan warna ungu yang nantinya akan diserap pada panjang gelombang dengan nilai absorbansi DPPH yaitu pada 517 nm (Kedare & Singh, 2011).

Perhitungan nilai aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode uji DPPH dapat dilakukan dengan menghitung terlebih dahulu nilai %inhibisi atau %penghambatan terhadap radikal bebas DPPH dengan data absorbansi spektrofotometri uv-visible dengan rumus sebagai berikut :

$$\%Antioksidan = \frac{A-Ac}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

Ac = Nilai absorbansi sampel

A = Nilai Absorbansi kontrol

Selanjutnya, hasil %inhibisi untuk setiap konsentrasi yang berbeda diolah dalam bentuk persamaan regresi linear dengan nilai %inhibisi sebagai data (Y) dan konsentrasi larutan uji sebagai data (X). Setelah persamaan regresi linear diperoleh, selanjutnya dilakukan perhitungan nilai IC₅₀ dengan memasukkan nilai (X) sebagai nilai IC₅₀, sedangkan nilai (Y) diganti dengan nilai 50.

2.6. Spektrofotometri UV-Visible

Metode analisis spektrofotometri menggunakan instrumen yang disebut dengan spektrofotometer. Spektrofotometer merupakan alat yang terdiri dari bagian spektrometer dan bagian fotometer. Spektrometer dapat menghasilkan suatu sinar dengan panjang gelombang tertentu, sedangkan fotometer akan bekerja untuk mengukur intensitas sinar (Warono & Syamsudin, 2013).

Dalam spektrofotometri UV-Visible akan dibagi dalam beberapa daerah cahaya. Suatu daerah cahaya akan diabsorpsi oleh atom atau molekul. Panjang gelombang cahaya yang diabsorpsi berbeda untuk setiap senyawa analit yang diteliti. Spektrum elektromagnetik meliputi dari daerah panjang gelombang yang cukup luas dari sinar gamma bergelombang pendek dan memiliki energi yang tinggi hingga masuk pada panjang gelombang mikro (Marzuki Asnah, 2012).

Spektrum absorpsi yang berada dalam daerah ultraviolet dan sinar tampak (visible) secara umum terdiri dari beberapa pita absorpsi yang lebar, dan semua

molekul dapat menyerap radiasi dalam daerah ultraviolet hingga daerah sinar tampak (visible). Sehingga elektron baik yang digunakan secara bersama atau tidak, dieksitasi menuju tingkat energi yang lebih tinggi. Panjang gelombang pada saat absorpsi akan bergantung pada bagaimana eratny elektron terikat di dalam suatu molekul. Elektron dalam suatu ikatan kovalen tunggal akan erat ikatannya dan radiasi yang membutuhkan energi tinggi, panjang gelombang pendek akan diperlukan proses eksitasinya (Wunas, 2011).

2.6.1. Prinsip Kerja Spektrofotometri UV-Visible

Pada metode spektrofotometri UV-Visible yang diamati adalah interaksi adanya absorbansi pada panjang gelombang tertentu pada daerah sinar UV dan sinar tampak (visible) dari larutan sampel yang dianalisis. Nilai absorbansi ideal dengan ketelitian yang baik yaitu berada pada *range* nilai antara 0,2 – 0,8. Spektrofotometer UV-Visible menggunakan sinar dengan 20 panjang gelombang dengan *range* nilai 180 – 380 nm untuk daerah ultraviolet (UV) dan *range* 380 – 780 nm untuk daerah sinar tampak (visible). Prinsip dari pengukuran menggunakan spektrometer didasarkan pada persamaan hukum Lambert-Beer, yaitu dengan prinsip seberkas sinar dilewatkan pada suatu larutan pada panjang gelombang tertentu, oleh karena itu sinar tersebut sebagian ada yang diteruskan dan lainnya akan diserap oleh larutan (Warono & Syamsudin, 2013).

2.6.2. Keunggulan dan Kelemahan Spektrofotometri UV-Visible

Metode spektrofotometri UV-Visible memiliki keunggulan yaitu memiliki cara sederhana dalam menetapkan kuantitas dari suatu zat atau analit dalam angka yang sangat kecil. Selain itu, hasil analisis yang diperoleh memiliki nilai akurasi yang tinggi dan hasil angka yang terbaca langsung dapat tercatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk hasil angka digital ataupun grafik yang telah diolah dalam bentuk regresinya (Yahya, 2013).

Metode Spektrofotometri UV-Visible memiliki kekurangan yaitu senyawa atau analit yang dianalisis harus memiliki gugus kromofor (gugus yang menghasilkan warna), memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, dan

memiliki panjang gelombang yang letaknya berada pada jangkauan daerah ultraviolet dan sinar tampak (*visible*). Hasil absorbansi yang diperoleh dari analisis akan dipengaruhi oleh pH larutan, suhu, kebersihan kuvet yang digunakan, dan adanya zat pengganggu selama analisis (Tetha & Sugiarto, 2016).