

2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Alga Coklat *Sargassum duplicatum*

2.1.1 Karakteristik *Sargassum duplicatum*

Sargassum duplicatum memiliki bentuk *thallus* silindris atau gepeng, banyak percabangan yang menyerupai pepohonan darat, bentuk daun melebar, lonjong atau seperti pedang, mempunyai gelembung udara (*bladder*) yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter (di Indonesia terdapat spesies yang panjangnya 3 meter) dan warna *thallus* umumnya cokelat (Nybakken *et al.*, 2006). Klasifikasi *Sargassum duplicatum* adalah sebagai berikut (Fahri, 2010). Gambar *Sargassum duplicatum* dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Class : Phaeophyceae
Ordo : Fucales
Family : Sargassaceae
Genus : *Sargassum*
Spesies : *Sargassum duplicatum*



Gambar 1. *Sargassum duplicatum* (Hasil Penelitian, 2013)

2.1.2 Manfaat Alga Coklat

Hasil penelitian beberapa tahun terakhir menunjukkan adanya kandungan antioksidan diberbagai jenis alga di luar negeri sehingga berpotensi sebagai produk pangan fungsional. Selama ini sumber antioksidan yang dikenal masyarakat adalah yang berasal dari tanaman darat dan masih sangat jarang yang mengetahui potensi

alga sebagai antioksidan. Mengingat alga memiliki potensi yang besar di Indonesia dan selama ini digunakan sebagai penghasil agar-agar, karaginan dan asam alginat yang difungsikan dalam bidang pangan, mikrobiologi, bioteknologi, tekstil dan farmasi, maka perlu adanya informasi mengenai potensi fungsional alga dalam bidang kesehatan sebagai antioksidan.

Alga coklat merupakan salah satu sumber bahan alam hayati lautan yang sangat berpotensi sebagai sumber senyawa antioksidan dan banyak digunakan sebagai suplemen kesehatan. Alga coklat mengandung vitamin, mineral, asam amino, dan enzim, sehingga dipercaya dapat membersihkan tubuh dari ancaman radikal bebas (Putra, 2008).

2.1.3 Senyawa Aktif *Sargassum duplicatum*

Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi pemanfaatan alga dalam bentuk olahan semakin meluas. Kandungan metabolit sekunder dalam alga coklat juga sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkohol, phenol dan vitamin. Ternyata alga coklat sangat kaya akan kandungan steroid, alkolid dan phenol. (Rachmat, 1999).

Menurut Sugiarto (2013), Alga coklat sebagai sumber senyawa bioaktif khususnya *Sargassum* dan *Turbinaria*. Senyawa-senyawa yang terdapat pada alga coklat mengandung banyak komponen, dalam dikatakan didalam alga coklat terdapat senyawa fenol, flavonoid, tanin dan lainnya.

Fenol

Sargassum duplicatum mengandung *fucoidan* dan komponen *fenolik*. Jenis komponen *fenolik* yang banyak dijumpai pada rumput laut adalah *phlorotanin* yang berkisar antara 0,74% sampai 5,06%. Penelitian dari Majiatun *et al.*, (2008)

membuktikan bahwa rumput laut memiliki banyak kadar fenolik (total fenol) yang berbeda-beda tergantung jenis pelarutnya dan metode ekstraksi serta spesies rumput laut itu sendiri (Muawannah, 1996).

Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang baik untuk makanan maupun untuk pengobatan seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas (Boer, 2000). Stres oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh (Trilaksani, 2003). Senyawa antioksidan merupakan suatu inhibitor yang digunakan untuk menghambat autooksidasi. Efek antioksidan senyawa fenolik dikarenakan sifat oksidasi yang berperan dalam menetralisasi radikal bebas (Rahayu, 2012).

Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun nonenzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida dan dengan demikian melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak (Utama, 2002)

Flavonoid merupakan kelompok besar fitokimia yang bersifat melindungi dan banyak terdapat pada buah dan sayuran. Flavonoid sering dikenal sebagai bioflavonoid yang berperan sebagai antioksidan. Antioksidan dapat menetralkan atau menginaktifkan reaksi yang tidak stabil pada molekul yang disebut sebagai radikal bebas yang dapat menyerang sel tubuh. Flavonoid terdapat beberapa jenis dan masing-masing berperan dalam menjaga kesehatan (Winarsi,2007)

Tanin

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa tanin ini banyak di jumpai pada tumbuhan. Tanin

dahulu digunakan untuk menyamakan kulit hewan karena sifatnya yang dapat mengikat protein. Selain itu juga tanin dapat mengikat alkaloid dan gelatin.

Tanin secara umum didefinisikan sebagai senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Berdasarkan strukturnya, tanin dibedakan menjadi dua kelas yaitu tanin interkondensasi (condensed tannins) dan tanin-terhidrolisiskan (hydrolysable tannins) (Hagerman *et al.*, 1992; Harbone, 1996).

2.2 Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella sp.*)

Minyak ikan lemuru merupakan minyak limbah pengolahan ikan lemuru yang diperoleh dari daerah Muncar (Jawa Timur) yang mempunyai kandungan minyak sebanyak 4,511,8%. Ikan lemuru sebanyak 100 kg akan diperoleh minyak ikan lemuru sebanyak 20 kg. Limbah dari minyak ikan lemuru masih mengandung asam lemak tidak jenuh ganda omega-3 yang sangat tinggi sehingga perlu terdapat penimbunan bahan-bahan yang mengandung kolesterol pada dinding pembuluh darah yang menyebabkan pembekuan sehingga menyebabkan penyumbatan pada pembuluh darah (Rusmana *et al.*, 2008) .

Total kandungan asam lemak n-3 terbanyak adalah pada spesies ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) ukuran besar (>20 cm panjang total) adalah sebesar 69,8 g/100 g minyak atau mendekati 70% dari kandungan minyaknya. Sedangkan individu asam lemak n-3 yang terdapat pada ikan lemuru (*Sardinella longiceps*) adalah 18 : 3n-3, 18 : 4n-3, 20:3n-3, 20:3n-3 (EPA), 22 : 3n-3 dan 22 : 6n-3 (DHA), porsi paling banyak adalah DHA sebesar 26,2 g/100 g minyak atau sebesar 26 persen, diikuti oleh EPA sebesar 21,8 g/100 g minyak atau hampir 22 persen (Sumardi, 1998).

2.3 Radikal Bebas

Radikal bebas (*free radical*) merupakan salah satu bentuk senyawa yang mempunyai elektron tidak berpasangan, sehingga dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal (Winarsi, 2007). Adanya elektron tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan. Radikal bebas ini akan merebut elektron dari molekul lain yang ada di sekitarnya untuk menstabilkan diri. Radikal bebas erat kaitannya dengan kerusakan sel, kerusakan jaringan, dan proses penuaan (Fessenden dan Fessenden, 1986).

Radikal bebas akan menyerang biomakromolekul penting dalam tubuh seperti komponen penyusun sel, yaitu protein, asam nukleat, lipid dan polisakarida. Target utama radikal bebas adalah protein, asam lemak tak jenuh dan lipoprotein serta DNA termasuk polisakaridanya. Asam lemak tak jenuh adalah yang paling rentan. Radikal bebas akan merusak lemak tak jenuh ganda pada membran sel sehingga dinding sel menjadi rapuh, merusak pembuluh darah dan menimbulkan aterosklerosis. Radikal bebas juga merusak basa DNA sehingga mengacaukan sistem informasi genetika dan membentuk sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida dan menimbulkan penyakit degeneratif (Winarsi, 2007).

Serangan radikal bebas terhadap molekul sekelilingnya dapat menyebabkan reaksi berantai dan kemudian menghasilkan senyawa radikal baru. Hal ini akan menimbulkan kerusakan sel atau jaringan, penyakit degeneratif hingga kanker. Berbagai gangguan akibat kerja radikal bebas adalah gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, molekul yang tidak teridentifikasi oleh sistem imun bahkan mutasi. Semua gangguan tersebut memicu timbulnya berbagai macam penyakit (Sadikin, 2001 dalam Winarsi, 2007).

Secara umum, tahapan reaksi pembentukan reaksi radikal bebas melalui 3 tahapan reaksi yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Tahap inisiasi merupakan awal pembentukan radikal bebas, tahap propagasi merupakan pemanjangan rantai dan tahap terminasi merupakan bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah. Reaktivitas radikal bebas dapat dihambat dengan cara (Winarsi, 2007) : Mencegah (*prevention*) atau menghambat (*inhibition*) pembentukan radikal bebas baru, menginaktivasi (*inactivation*) atau menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*) dan memotong propagasi (pemutusan rantai) dan memperbaiki (*repair*) kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas

2.4 Senyawa Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau *reductan*/reduktor. Antioksidan mampu menghambat reaksi oksidasi dengan cara mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sehingga kerusakan sel dapat dicegah. Senyawa ini mempunyai berat molekul kecil tapi mampu menginaktivasi reaksi oksidasi dengan mencegah terbentuknya radikal (Winarsi, 2007). Tamat *et al.* (2007) menyatakan bahwa antioksidan merupakan zat yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah terjadinya proses oksidasi. Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting dalam mempertahankan mutu produk pangan.

Tubuh manusia mempunyai sistem antioksidan yang diproduksi secara kontinue untuk menangkal atau meredam radikal bebas, seperti enzim superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase. Bila jumlah senyawa radikal bebas melebihi jumlah antioksidan alami dalam tubuh maka radikal bebas akan

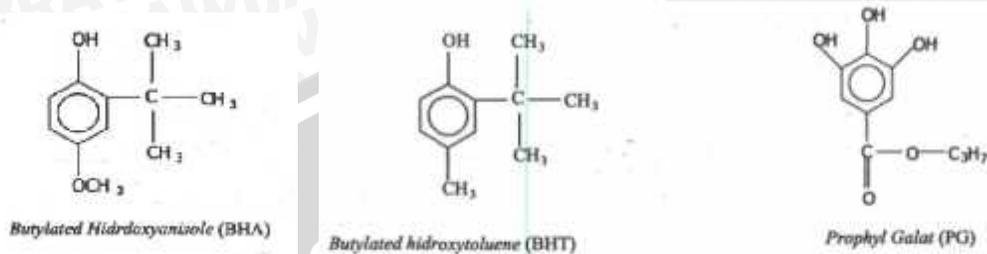
menyerang komponen lipid, protein dan DNA. Sehingga tubuh kita membutuhkan asupan antioksidan yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas tersebut (Prakash, 2001; Winarsi, 2007; Hapsari, 2008).

2.4.1 Jenis- Jenis Antioksidan

Ada dua jenis antioksidan berdasarkan sumber perolehannya yaitu, antioksidan alami, dan antioksidan buatan (sintetik). Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidase lipid pada makanan (Kuncahyo, 2007). Sedangkan Antioksidan sintetik yang diizinkan untuk makanan adalah BHA (*Butil Hidrosik Anisol*) dan BHT (*Butil Hidroksi Toluen*). Antioksidan sintesis sendiri yang diproduksi secara kimia dianggap kurang aman, untuk itulah banyak konsumen yang saat ini lebih memilih mengkonsumsi antioksidan yang bersifat alami (Sarastani, *et al.*, 2002).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibedakan ke dalam dua golongan yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Antioksidan secara alami terdapat pada lemak nabati. Contoh antioksidan alami antara lain tokoferol. Antioksidan sintetis ditambahkan ke dalam bahan pangan untuk mencegah ketengikan. Batas penggunaan antioksidan sintetis harus diperhatikan karena sebagian besar antioksidan sintetis adalah senyawa-senyawa fenolik yang dapat menyebabkan keracunan pada konsentrasi tertentu. Oleh karena itu dalam menggunakan antioksidan sintetis harus memenuhi syarat-syarat aman bagi kesehatan, efektif pada konsentrasi rendah, larut dalam lemak, mempertahankan citarasa dari produk makanan, dan ekonomis. Antioksidan sintetis yang sering digunakan adalah

Buthylated Hydroxy Anisole (BHA), Buthylated Hydroxy Toluene (BHT), Propbly Gallate (PG). Dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Struktur molekul BHA, BHT, dan PG

2.4.2 Fungsi Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Hal tersebut dapat menghambat kerusakan sel. Berkaitan dengan reaksinya di dalam tubuh, status antioksidan merupakan parameter penting untuk memantau kesehatan seseorang. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk menangkal reaktivitas radikal bebas, yang secara berlanjut dibentuk sendiri oleh tubuh. Jika jumlah senyawa oksigen reaktif ini melebihi jumlah antioksidan dalam tubuh, kelebihannya akan menyerang komponen lipid, protein maupun DNA sehingga mengakibatkan kerusakan-kerusakan yang disebut dengan *stress oksidatif* (Winarsi 2007).

Antioksidan mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat terjadinya penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidase lipid pada makanan (Winarsi 2007). Antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dan berperan penting untuk mempertahankan mutu produk pangan. Berbagai kerusakan yaitu ketengikan, perubahan gizi, perubahan warna dan aroma serta kerusakan fisik lain pada produk pangan karena

oksidasi. Hernani dan Raharjo (2005), menambahkan bahwa proses oksidasi tersebut dapat dihambat oleh antioksidan.

Antioksidan merupakan substansi penting yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredamnya. Konsumsi antioksidan dalam jumlah memadai mampu menurunkan resiko terkena penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, kanker, aterosklerosis, osteoporosis dan lain-lain. Konsumsi makanan yang mengandung antioksidan dapat meningkatkan status imunologi dan menghambat timbulnya penyakit degeneratif akibat penuaan. Kecukupan antioksidan secara optimal dibutuhkan oleh semua kelompok umur (Winarsi, 2007).

2.4.3 Mekanisme Kerja Antioksidan

Menurut Khamidinal *et. al* (2007), Kerusakan minyak atau lemak yang disebabkan oleh reaksi oksidasi dapat dicegah dengan penambahan antioksidan. Antioksidan mampu menghambat terbentuknya radikal bebas pada tahap inisiasi dan menghambat kelanjutan reaksi autooksidasi pada tahap propagasi. Hal ini disebabkan karena antioksidan memiliki energi aktivasi yang rendah untuk melepaskan satu atom hidrogen kepada radikal lemak, sehingga tahap oksidasi lebih lanjut dapat dicegah. Secara umum mekanisme kerja antioksidan dapat dituliskan sebagai berikut:



2.5 Ekstraksi Komponen Bioaktif Alga Coklat

Ekstraksi merupakan proses penarikan atau pemisahan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Proses ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan komponen-komponen bioaktif suatu bahan (Harborne, 1987). Ada beberapa metode umum ekstraksi yang sering dilakukan, yaitu ekstraksi dengan pelarut (maserasi), destilasi, supercritical fluid extraction (SFE), pengepresan mekanik dan sublimasi (Gritter *et al.*, 1991), serta secara enzimatik (Tahezadeh and Karimi, 2007; Hammed *et al.*, 2013). Gritter *et al.*, (1991) menambahkan bahwa destilasi dan ekstraksi dengan pelarut merupakan metode ekstraksi yang sering digunakan.

Ekstraksi dengan pelarut didasarkan pada sifat kepolaran zat dalam pelarut saat ekstraksi. Senyawa polar hanya akan larut pada pelarut polar, seperti etanol, metanol, butanol dan air. Senyawa non-polar juga hanya akan larut pada pelarut non-polar, seperti eter, kloroform dan n-heksana (Gritter *et al.*, 1991). Jenis dan mutu pelarut yang digunakan menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, mempunyai titik didih yang rendah, murah, tidak toksik dan mudah terbakar (Harborne, 1987).

Pelarut yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, tanin, gula, asam amino dan glikosida. Pelarut semi polar mampu mengekstrak senyawa fenol, terpenoid, alkaloid, aglikon dan glikosida. Pelarut non polar dapat mengekstrak senyawa kimia seperti lilin, lipid dan minyak yang mudah menguap (Harborne, 1987).

Secara umum, ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan

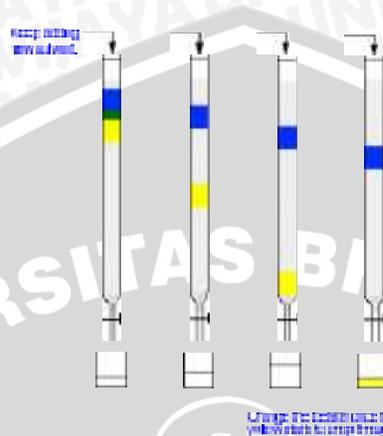
pelarut non polar lalu dengan pelarut yang kepolarannya menengah kemudian dengan pelarut polar, dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar. Metode ini berguna bila kita bekerja dengan skala gram. Sedangkan ekstraksi tunggal dilakukan dengan cara merendam sampel dengan satu jenis pelarut tertentu. Bila menggunakan beberapa pelarut yang berbeda maka pada setiap pelarut dicampurkan dengan sampel yang belum pernah dilarutkan dengan pelarut lain sebelumnya (Harborne, 1987).

2.6 Kromatografi Kolom

Kromatografi adalah proses pemisahan yang tergantung pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase diam dapat berupa pembentukan kolom dimana fase gerak dibiarkan untuk mengalir (kromatografi kolom). Perlu diperhatikan bahwa senyawa yang berbeda memiliki koefisien partisi yang berbeda antara fase gerak dan diam. Senyawa yang berinteraksi lemah dengan fase diam akan bergerak lebih cepat melalui sistem kromatografi. Senyawa dengan interaksi yang kuat dengan fase diam akan bergerak sangat lambat (Noviyanti, 2010).

Prinsip kerja kromatografi kolom adalah sebagai berikut: kolom gelas dengan kran pada salah satu ujungnya diisi oleh fase diam berupa *silica* atau alumina. Campuran yang akan dipisahkan dituangkan pada bagian atas kolom yang berisi fase diam. Begitu pula fase gerak berupa pelarut organik seperti heksan dan eter dialirkan dari bagian atas kolom. Komponen yang telah terpisah dari campurannya bergerak terbawa fase gerak ke bawah kolom. Jumlah komponen penyusun campuran dapat terlihat sebagai cincin-cincin berwarna sepanjang kolom gelas

(Hendayana, 2006). **Gambar 3.** menunjukkan perubahan yang mungkin terjadi sejalan dengan perubahan waktu.



Gambar 3. Proses kromatografi kolom (Chemistry,2007)

Menurut Sudarmadji (1996), pengisian kolom merupakan pekerjaan yang sangat menentukan keberhasilan alat. Pengisian biasanya dilakukan dengan menuangkan bubuk serbuk fase diam (bahan adsorben, resin atau gel) ke dalam kolom yang dasarnya sudah ditutup seraya diaduk dibagian atas atau kolom diketuk-ketuk sehingga gelembung udara keluar dan isi kolom tersebar merata. Bubur diisikan sampai mencapai ketinggian yang dikehendaki. Jika sudah tercapai, aliran cairan pelarut dimulai dengan membuka kran dibawah sampai isi kolom merata. Meskipun nampak sederhana namun pekerjaan ini memerlukan ketrampilan dan pengalaman sehingga hasilnya memuaskan.

2.7 Uji Aktivitas Antioksidan

Metode pengujian aktivitas antioksidan dikelompokkan menjadi 3 golongan. Golongan pertama adalah Hydrogen Atom Transfer Methods (HAT), misalnya Oxygen Radical Absorbance Capacity Method (ORAC) dan Lipid Peroxidation Inhibition Capacity Assay (LPIC). Golongan kedua adalah Electron Transfer Methods

(ET), misalnya Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) dan 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) Free Radical Scavenging Assay. Golongan ketiga adalah metode lain seperti Total Oxidant Scavenging Capacity (TOSC) dan Chemiluminescence (Badarinath *et al.*, 2010).

2.7.1 Uji DPPH

Salah satu metode yang paling umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah dengan menggunakan radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasar jenis radikal yang dihambat (Juniarti *et al.*, 2009). Kemudian Badarinath *et al.*, (2010) menambahkan bahwa metode lain selain DPPH membutuhkan reagen kimia yang cukup banyak, waktu analisis yang lama, biaya yang mahal dan tidak selalu dapat diaplikasikan pada semua sampel.

Pada metode ini, larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga DPPH akan berubah menjadi 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazin akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan dapat diamati menggunakan spektrofotometer sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan (Molyneux, 2004).

Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH menggunakan prinsip spektrofotometri. Senyawa DPPH dalam metanol berwarna ungu tua terdeteksi pada

panjang gelombang sinar tampak sekitar 515-517 nm. Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah dengan nilai IC₅₀ (Inhibitor Concentration).

IC₅₀ merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang mampu mereduksi aktivitas DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm (IC₅₀ < 50 ppm), kuat (50 ppm < IC₅₀ < 100 ppm), sedang (100 ppm < IC₅₀ < 150 ppm), lemah (150 ppm < IC₅₀ < 200 ppm), dan sangat lemah (IC₅₀ > 200 ppm). Struktur DPPH radikal bebas dan DPPH yang telah bereaksi dengan antioksidan dapat dilihat pada **Gambar 4**. (Molyneux, 2004)



a. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil

b. 1,1- diphenyl-2-picrylhydrazin

Gambar 4. Struktur DPPH (a) Radikal Bebas dan (b) Radikal Bebas yang Telah Bereaksi dengan Antioksidan (Molyneux, 2004)

2.7.2 Uji Peroksida

Bilangan peroksida didefinisikan sebagai jumlah milliequivalen peroksida dalam setiap 1000 g minyak atau lemak. Bilangan peroksida >20 menunjukkan kualitas minyak yang sangat buruk, biasanya teridentifikasi dari bau yang tidak enak (Rahman, 2007 dalam Dwi Krisna Fatoni, 2012). Bilangan peroksida adalah nilai terpenting untuk menentukan derajat kerusakan pada minyak atau lemak. Asam

lemak tidak jenuh dapat mengikat oksigen pada ikatan rangkapnya sehingga membentuk peroksida (Ketaren,1986).

Pengukuran angka peroksida pada dasarnya adalah mengukur kadar peroksida dan hiperoksida yang terbentuk pada tahap awal reaksi oksidasi lemak. Oksidasi lemak oleh oksigen terjadi secara spontan jika bahan dibiarkan kontak dengan udara, sedangkan kecepatan proses oksidasinya tergantung pada tipe lemak dan kondisi penyimpanannya (Aminah, 2010).

2.7.3 Uji Iod

Bilangan iodin menyatakan derajat ketidak jenuhan asam lemak penyusun minyak. Asam lemak tidak jenuh mampu mengikat iodium dan membentuk persenyawaan yang jenuh. Banyaknya iodium yang diikat menunjukkan banyaknya ikatan rangkap dimana asam lemak tidak jenuh mampu mengikat iodium dan membentuk persenyawaan yang jenuh (Khotimah, 2013).

Menurut Hidayati (2002) menyatakan bahwa, iodium akan mengadisi ikatan rangkap asam lemak tidak jenuh maupun dalam bentuk ester. Bilangan iodium tergantung pada jumlah asam lemak tidak jenuh dalam lemak. Semakin banyak jumlah asam lemak tidak jenuh dalam minyak semakin tinggi pula bilangan iodium yang dikandung oleh minyak tersebut. Adanya ikatan rangkap pada asam lemak tidak jenuh akan memudahkan terjadinya oksidasi di udara atau jika ada air dan dipanaskan.

2.8 Spektrofotometer UV-Vis

Umumnya spektroskopi dengan sinar ultraviolet (UV) dan sinar tampak (VIS) dibahas bersama karena sering kedua pengukuran dilakukan pada waktu yang

sama. Karena spektroskopi UV-VIS berkaitan dengan proses berenergi tinggi yakni transisi elektron dalam molekul, informasi yang didapat cenderung untuk molekul keseluruhan bukan bagian-bagian molekulnya. Metode ini sangat sensitif dan dengan demikian sangat cocok untuk tujuan analisis. Spektroskopi UV-VIS bersifat sangat kuantitatif dan jumlah sinar yang diserap oleh sampel disebut juga dengan hukum Lambert-Beer (Takeuchi, 2006).

Spektrofotometer *UV-Visible* adalah alat yang umum digunakan di laboratorium kimia. Alat ini biasanya digunakan untuk analisa kimia kuantitatif, namun dapat juga digunakan untuk analisa kimia kimia semi kualitatif. Prinsip kerja spektrofotometer UV-Vis didasarkan pada fenomena penyerapan sinar oleh spesi kimia tertentu di daerah ultra lembayung (ultra violet) dan sinar tampak (visible) (Huda, 2001). Ditambahkan oleh Riyadi (2009), spektrofotometri menggunakan dua buah sumber cahaya berbeda, sumber cahaya UV dan sumber cahaya visible. Meskipun untuk alat yang lebih canggih sudah menggunakan hanya satu sumber sinar sebagai sumber UV dan Vis, yaitu photodiode yang dilengkapi dengan monokromator. Untuk sistem spektrofotometri, UV-Vis paling banyak tersedia dan paling populer digunakan. Kemudian metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sampel berwarna juga untuk sampel tak berwarna.

Ditambahkan oleh Apriyanto (1989), pada metode spektrofotometri, panjang gelombang sinar yang digunakan harus dipilih terlebih dahulu agar komponen yang dianalisa menyerap sinar tersebut semaksimal mungkin. Dengan demikian penyerapan sedapat mungkin tidak dipengaruhi oleh komponen pengganggu maupun variasi yang mungkin terjadi dalam analisa. Jika bahan yang dianalisa mempunyai warna tertentu, maka warna komplementernya merupakan bagian panjang gelombang yang sesuai untuk analisa tersebut. Panjang gelombang

maksimum tersebut di dalam spektrofotometri dapat ditentukan dengan membuat kurva hubungan antara absorbans dan panjang gelombang. Panjang gelombang yang menghasilkan absorbans tertinggi merupakan panjang gelombang maksimumnya. Pada panjang gelombang maksimum ini absorptifitas molar (ϵ) dapat ditentukan dengan menggunakan hukum Lambert-Beer sebagai berikut :

$$A = \epsilon bc$$

Dimana, A = absorbans

ϵ = absorptifitas molar

b = lebar bagian dalam cuvet, cm

c = konsentrasi, Molar

Spektrofotometer sangat berhubungan dengan pengukuran jauhnya pengabsorbansian energi cahaya oleh suatu sistem kimia sebagai fungsi panjang gelombang dengan absorban maksimum dari suatu unsur atau senyawa. Konsentrasi unsur atau senyawa dapat dihitung dengan menggunakan kurva standar yang diukur pada panjang gelombang absorban tersebut, yaitu panjang gelombang yang diperoleh dari hasil nilai absorbansi yang tinggi. Spektrum absorban selain bergantung pada sifat dasar kimia, juga bergantung pada faktor-faktor lain. Perubahan pelarut sering menghasilkan pergeseran dari pita absorbansi. Larutan pembanding dalam spektrofotometri pada umumnya adalah pelarut murni atau suatu larutan blanko yang mengandung sedikit zat yang akan ditetapkan atau tidak sama sekali (Day dan Underwood, 1999).

2.9 Uji LC-MS

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) adalah suatu metode pemisahan modern dalam analisa farmasi yang dapat digunakan sebagai uji

identitas dan uji kemurnian. Yang menjadi titik beratnya yaitu untuk menganalisa senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak dapat dianalisis dengan Kromatografi Gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisa menggunakan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul. (Lindsay, 1992).

Menurut Ginting (2008), *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bioanalisis dimulai pada akhir tahun 1980an. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS antara lain : 1.) Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor. 2.) Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer massa "klasik", penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi. 3.) Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. 4.) Kaya informasi. Sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.