

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Diskripsi dan Klasifikasi Keong mas (*Pomacea canaliculata* L)

Keong mas atau *golden apple snail* (GAS) merupakan salah satu jenis moluska air tawar yang berasal dari dataran hujan di sepanjang Sungai Paraguay dan Parana yang memotong Paraguay, Brazil, Bolivia dan Argentina. Di Asia, keong mas pertama kali dikenal di Taiwan pada tahun 1979 dan saat ini telah tersebar luas di seluruh penjuru benua Asia. Seiring dengan proses penyebarannya, keong mas kini telah menjadi salah satu hama padi yang paling berbahaya di negara-negara penghasil beras di Asia, seperti Filipina, Vietnam, Thailand dan Indonesia (Joshi, 2005).

Klasifikasi keong mas (*Pomacea canaliculata* L) menurut Lamarck (1822) adalah sebagai berikut, bentuk morfologi keong mas dapat di lihat pada Gambar

1.

Filum	: Molusca
Kelas	: Gastropoda
Subkelas	: Prosobranchiata
Ordo	: Mesogastropoda
Famili	: Ampullariidae
Genus	: <i>Pomacea</i>
Spesies	: <i>Pomacea canaliculata</i>



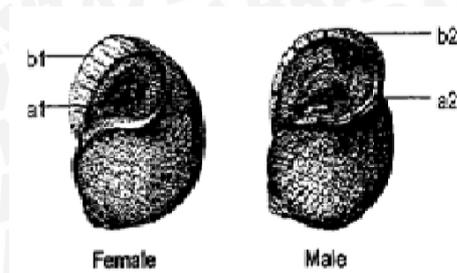
Gambar 1. Keong mas

Keong mas hidup di kolam, sawah yang beririgasi dan kanal. Keong mas membenamkan diri pada tanah lembab selama musim kering. Keong mas dapat bertahan hidup hingga 6 bulan dengan melakukan estivasi dengan cara menutup operkulum dan membenamkan diri dalam tanah. Keong mas menjadi aktif kembali ketika tanah tempat hidupnya tergenang air. Keong mas dapat bertahan hidup pada kondisi lingkungan yang keras, seperti pada perairan tercemar atau perairan yang memiliki kandungan oksigen terlarut yang rendah. Hal ini dikarenakan keong mas memiliki insang (*ctenidium*) dan organ menyerupai paru-

paru, sehingga memungkinkan keong mas dapat bertahan hidup di dalam dan di luar air. Keong mas akan melakukan migrasi jika tinggi permukaan air hanya setengah dari tinggi cangkangnya (DA-PhilRice 2001; Joshi, 2005).

Keong mas memiliki karakteristik khusus yang dapat digunakan untuk membedakan antara keong mas dengan keong-keong jenis lain yang hidup pada habitat yang sama. Keong mas dewasa memiliki cangkang berwarna coklat dan daging berwarna putih krem hingga emas kemerah-merahan atau oranye. Ukuran tubuhnya sangat beragam dan bergantung pada ketersediaan makanan. Ukuran diameter cangkang keong mas dapat mencapai 4 cm dengan berat 10-20 gram (Ardhi, 2008). Keong mas memiliki sifat destruktif adalah ketika ukuran cangkangnya sebesar 10 mm (sebesar biji jagung) hingga 40 mm (sebesar bola ping pong) (DA-PhilRice, 2001).

Keong mas jantan dan betina memiliki beberapa perbedaan fisik yang dapat dilihat langsung oleh mata biasa. Perbedaan tersebut terletak pada bentuk operkulum dan lengkungan cangkang. Keong mas betina memiliki operkulum berbentuk cekung (a1), sedangkan operkulum berbentuk cembung (a2) dimiliki oleh keong mas jantan. Cangkang keong mas betina dewasa melengkung ke arah dalam (b1), sedangkan cangkang keong mas jantan dewasa melengkung ke arah luar (b2) (DA-PhilRice 2001). Pada sebuah sawah, jumlah keong mas betina diduga memiliki jumlah dua kali lebih banyak. Hal ini mengindikasikan bahwa keong mas jantan tidak memiliki daya tahan hidup selama daya tahan hidup keong mas betina (Joshi, 2005). Perbedaan antara keong mas jantan dan betina dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Perbedaan keong mas jantan dan betina

(Sumber: DA-PhilRice, 2001)

Keong mas merupakan hewan herbivora yang sangat rakus dan bersifat nocturnal. Keong mas dapat menghancurkan padi yang baru ditanam selama masih terdapat air dalam sawah tersebut. Keong mas memotong pangkal padi muda dengan menggunakan gigi radula dan mengunyah pelepah daun padi yang lunak (Joshi, 2005). Istilah hewan herbivora tidaklah cocok bila disematkan pada keong mas karena hewan ini juga memakan keong-keong jenis lain, seperti *Biomphalaria glabrata* (Paulinyi dan Paulini 1972) dan *Bulinus* sp. yang merupakan inang perantara parasit trematoda yang menyebabkan penyakit gatal dan *schistosomiasis* (Sulistiono, 2007), serta memiliki sifat kanibalisme, sehingga keong mas lebih cocok dikategorikan sebagai hewan omnivora.

2.1.1 Pemanfaatan Keong mas

Pemanfaatan keong mas, baik dibidang penyediaan pangan maupun pakan, merupakan salah satu bentuk usaha pengendalian keong mas yang merupakan hama berbahaya bagi sektor pertanian, khususnya pertanian padi. Penggunaan moluskosida dalam mengendalikan keong mas, justru malah membunuh organisme non-target, seperti ikan ataupun organisme bermanfaat lainnya yang hidup pada habitat yang sama dengan keong mas (Joshi, 2005). Nurjanah *et al.* (1996) menambahkan bahwa keong mas memiliki resistensi tinggi terhadap pestisida ataupun moluskosida dalam dosis tinggi sekali pun. Fakta

tersebut menunjukkan bahwa usaha pengendalian populasi keong mas yang tidak melibatkan senyawa kimia, seperti pestisida dan moluskosida mutlak diperlukan.

Beberapa bentuk pengendalian keong mas tanpa menggunakan bahan kimia, diantaranya pemanfaatan predator atau musuh alami dari keong mas, yaitu semut merah yang memakan telur-telur keong mas, tikus yang memakan daging keong, ikan mas hias atau koi, serta itik-itik karnivora yang memakan daging serta keong-keong muda (DA-PhilRice 2001; Ako dan Tamaru 2006). Hasil penelitian Aditya dan Raut (2005) menunjukkan bahwa lintah jenis *Glossiphonia* weberi juga merupakan predator potensial keong mas di India. Lintah-lintah ini mampu membunuh maksimum 3 ekor keong per hari.

Pemanfaatan tanaman beracun juga diterapkan untuk mengendalikan populasi keong mas, seperti gugo (*Entada phaseikaudes* K Meer), sambong (*Blumea balsamifera*), gabihan (*Monochoria vaginalis*), tembakau (*Nicotina tabacum* L), calamansi (*Citrus microcarpa* Bunge), makabuhay (*Tinospora rumphii* Boerl) dan buah paprika merah. Bagian tanaman ini, seperti daun dan buah, diletakkan pada kanal yang dibuat untuk menjebak keong mas agar terperangkap dalam kanal tersebut dan memakan tanaman beracun itu (DA-PhilRice, 2001).

Pengumpulan keong-keong di area persawahan juga termasuk salah satu usaha pengendalian hama keong mas ini. Keong-keong yang terkumpul biasanya diolah menjadi bahan pangan ataupun pakan bagi ternak. Pengolahannya sebagai bahan pangan telah banyak dilakukan, seperti fortifikasi daging keong mas dalam pembuatan kerupuk keong mas (Nurjanah *et al.* 1996), fortifikasi daging keong mas dalam pembuatan *cracker* "chicharon" (DA-PhilRice, 2001) pembuatan kecap, sate keong, pepes keong, sambel keong, dendeng dan

menu keong lainnya (Sulistiono, 2007). Keong mas juga digunakan sebagai obat penyakit kulit, penyakit kuning, penyakit liver dan ayan (Nurjanah *et al.*, 1996).

Menurut Sulistiono (2007), pemanfaatan keong mas sebagai pakan ternak juga telah banyak dikembangkan. Dalam bentuk segar, keong mas digunakan sebagai pakan sumber protein untuk ternak itik, ayam broiler, burung puyuh, budidaya ikan patin, ikan gabus, ikan sidat, udang, kepiting dan lobster air tawar. Pemberian pakan berbasis protein keong mas pada ternak burung puyuh (*Coturnix coturnix*) dan budidaya ikan gabus (*Chana striata*) serta ikan sidat (*Anguilla sp*), memberikan pertumbuhan yang baik pada hewan-hewan budidaya tersebut.

2.2 Kandungan Senyawa Bioaktif Keong mas

Keong mas diketahui mengandung berbagai jenis bahan aktif yang berguna bagi manusia. Menurut Susanto (2010), hasil uji fitokimia dari keong mas adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar Keong mas

Uji Fitokimia	Jenis Pelarut		
	Kloroform	Etil Asetat	Metanol
Alkaloid	-	-	+
Steroid/triterpenoid	+	+	+
Flavonoid	-	+	+
Saponin	-	-	-

2.2.1 Alkaloid

Komponen alkaloid didefinisikan sebagai substansi dasar yang memiliki satu atau lebih atom nitrogen yang bersifat basa dan tergabung dalam suatu sistem siklis, yaitu cincin heterosiklik (Harborne, 1984). Komponen alkaloid ini hanya ditemukan pada ekstrak kasar metanol (polar) keong mas. Alkaloid

umumnya larut pada pelarut organik (non polar), sedangkan beberapa kelompok pseudoalkaloid dan protoalkaloid larut dalam air (polar) (Lenny, 2006).

Menurut Kutchan (1995), alkaloid digolongkan sebagai metabolit sekunder karena kelompok molekul ini merupakan substansi organik yang tidak bersifat vital bagi organisme yang menghasilkannya.

Alkaloid diketahui berasal dari sejumlah kecil asam amino yaitu ornitin dan lisin yang menurunkan alkaloid alisiklik; fenilalanin dan tirosin yang menurunkan alkaloid jenis isokuinolin; dan triftopan yang menurunkan alkaloid indol. Reaksi utama yang mendasari biosintesis senyawa alkaloid adalah reaksi *Mannich*, dimana menurut reaksi ini suatu aldehid berkondensasi dengan suatu amina menghasilkan suatu ikatan karbon-nitrogen dalam bentuk imina atau garam iminium, diikuti oleh serangan suatu atom karbon nukleofilik yang dapat berupa suatu enol atau fenol (Lenny, 2006).

Alkaloid kerap kali bersifat racun pada manusia, tetapi ada juga yang memiliki aktivitas fisiologis pada kesehatan manusia sehingga digunakan secara luas dalam pengobatan (Harborne, 1984).

2.2.2 Steroid/triterpenoid

Pengujian yang telah digunakan secara luas untuk mendeteksi triterpenoid adalah dengan pereaksi Liebermann-Burchard, yang memberikan warna biru-hijau pada triterpenoid dan steroid. Triterpenoid merupakan komponen dengan kerangka karbon yang tersusun oleh 6 unit isoprene dan dibuat secara biosintesis dari skualen (C₃₀ hidrokarbon asiklik). Triterpenoid memiliki struktur siklik yang kompleks, sebagian besar terdiri atas alkohol, aldehid, atau asam karboksilat. Triterpenoid tidak berwarna, jernih, memiliki titik lebur tinggi dan merupakan komponen aktif yang sulit dikarakterisasi (Harborne, 1984).

Steroid memiliki inti yang sama seperti triterpenoid tetrasiklik, tetapi hanya dua gugus metil yang terikat pada sistem cincin yaitu pada posisi 10 dan 13. Steroid pada hewan adalah kolesterol yang terdapat pada lipid permukaan yang berperan dalam struktur membran dan pada hewan mamalia terdapat pada hormon kelamin eksogen. Steroid pada hewan lainnya adalah asam kolanat, kolekalsiferol dan 1,25 – dihidroksivitamin D (Padmawinata, 1995). Ditambah dengan penjelasan (Harborne 1984), yang menyatakan bahwa sistem cincin pada steroid disebut dengan *cyclopentana perhydrophenanthrene*. Pada hewan senyawa ini bertindak sebagai hormon seks, hormon adrenal, asam empedu, dan lain sebagainya. Steroid yang terdeteksi pada ekstrak keong mas diduga merupakan hormon adrenal dan hormon seks (*progesterone*, *17- β -estradiol*, *testosterone*, *4-androstene-dione* dan *cortisol*) (Susanto, 2010).

Steroid merupakan golongan triterpena yang tersusun atas sistem cincin *cyclopentana perhydrophenanthrene*. Steroid pada mulanya dipertimbangkan hanya sebagai komponen pada substansi hewan saja (sebagai hormon seks, hormon adrenal, asam empedu, dan lain sebagainya), akan tetapi akhir-akhir ini steroid juga ditemukan pada substansi tumbuhan (Harborne, 1984). Steroid ini diduga memiliki efek peningkat stamina tubuh (aprodisiaka) dan anti-inflamasi.

Menurut hasil penelitian Setzer (2008), triterpenoid alami memiliki aktivitas antitumor karena mempunyai kemampuan menghambat kinerja enzim topoisomerase II, dengan cara berikatan dengan sisi aktif enzim yang nantinya akan mengikat DNA dan membelahnya. Hal ini menyebabkan enzim menjadi terkunci dan tidak dapat mengikat DNA.

Steroid merupakan golongan dari senyawa triterpenoid. Hormon steroid dalam mamalia dibiosintesis dari kolesterol. Steroid berupa padatan kristal yang berwarna putih dan dapat berbentuk jarum kecil, lembaran, lempengan atau partikel amorf tergantung pelarut yang digunakan dalam kristalisasi. Steroid

mempunyai 17 atom karbon atau lebih sehingga golongan senyawa ini cenderung tidak larut dalam air (Wilson dan Gisvold 1982).

2.2.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol, karena itu larutan ekstrak yang mengandung komponen flavonoid akan berubah warna jika diberi larutan basa atau ammonia. Flavonoid dapat dikelompokkan menjadi 9 kelas, yaitu anthosianin, proanthosianidin, flavonol, flavon, glikoflavon, biflavonil, *chalcone* dan *aurone*, flavanon, serta isoflavon. Flavonoid pada tanaman berikatan dengan gula sebagai glikosida dan adapula yang berada dalam aglikon (Harborne, 1984).

Flavonoid sangat efektif untuk digunakan sebagai antioksidan (Astawan dan Kasih 2008), dan hal ini pun terbukti dari hasil penelitian Bernardi *et al.* (2007) yang menunjukkan bahwa seluruh komponen flavonoid yang diisolasi dari *Hypericum ternum* memiliki aktivitas antioksidan, walaupun kapasitas peredaman radikal bebas DPPH oleh masing-masing komponen flavonoid tersebut berbeda-beda.

Senyawa flavonoid dapat mencegah penyakit kardiovaskuler dengan cara menurunkan laju oksidasi lemak. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa flavonoid dapat menurunkan hiperlipidemia pada manusia. Penghambatan oksidasi LDL pada kasus penyakit jantung oleh flavonoid, dapat mencegah pembentukan sel-sel busa dan kerusakan lipid (Astawan dan Kasih 2008). Selain itu, flavonoid juga memiliki fungsi sebagai antibakteri, anti-inflamasi, antitumor, antialergi, dan mencegah osteoporosis.

2.3 Pelarut

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengestrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Pemilihan pelarut untuk ekstraksi harus mempertimbangkan banyak faktor. Pelarut harus memenuhi syarat – syarat sebagai berikut murah dan mudah diperoleh, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif, dan tidak memepengaruhi kasiat.

Pelarut merupakan salah satu faktor utama menentukan keberhasilan dalam proses ekstraksi. Pelarut yag baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraki (vogel, 1987).

2.3.1 Metanol

Metanol, juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol* atau spiritus, adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH_3OH . Ia merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada "keadaan atmosfer" ia berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan dari pada etanol). metanol digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi etanol industry (Wikipedia, 2015).

Menurut Purwanti (2009), metanol termasuk dalam menstrum (agen ekstraksi) golongan alkohol. Alkohol yang biasanya digunakan sebagai menstrum dalam ekstraksi adalah golongan alkohol rendah atau yang memiliki rantai atom C pendek seperti metanol, etanol, propanol dan butanol. Metanol lebih polar dibandingkan dengan etanol karena memiliki jumlah atom C yang

lebih sedikit, sehingga senyawa yang terikat oleh kedua pelarut memiliki tingkat kepolaran yang berbeda.

2.3.2 Etil Asetat

Menurut Azzura *et al.*, (2015) etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, berbau khas yang digunakan sebagai pelarut tinta, perekat dan resin. Jika dibandingkan dengan etanol, etil asetat memiliki koefisien distribusi yang lebih tinggi dibanding etanol termasuk kelarutannya dalam gasoline. Selain dari penggunaannya sebagai pelarut, etil asetat dapat berfungsi sebagai bahan aditif untuk meningkatkan bilangan oktan pada bensin serta dapat berguna sebagai bahan baku kimia serba guna. Pembuatan etil asetat biasanya dilakukan dengan esterifikasi.

Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah. Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon (Tensiska *et al.*; 2007).

2.3.3 Kloroform

Menurut HAM (2006), kloroform merupakan salah satu senyawa yang mempunyai rumus kimia CHCl_3 zat cair mudah menguap, sukar terbakar (tetapi uapnya mudah terbakar), tidak larut dalam air tetapi larut dalam alkohol dan eter, uapnya bersifat membius dan terkena udara dan cahaya dapat membentuk gas fosgen yang beracun. Kloroform digunakan untuk pembuatan senyawa flirokarbon, sebagai pelarut (cat) dan sebagai anestesi.

2.4 Minyak Ikan Lemuru (*Sardinella Longiceps*)

Minyak merupakan trigliserida yang tersusun atas tiga unit asam lemak, berwujud cair pada suhu kamar (25°C) dan lebih banyak mengandung asam lemak tidak jenuh sehingga mudah mengalami oksidasi. Minyak yang berbentuk padat biasa disebut dengan lemak. Minyak dapat bersumber dari tanaman, misalnya minyak zaitun, minyak jagung, minyak kelapa. Minyak juga bersumber dari hewan seperti minyak ikan lemuru, minyak ikan paud dan lain – lain.

Lemak atau minyak yang terkandung dalam beberapa jenis ikan berdaging merah seperti ikan lemuru, tongkol dan ikan kembung umumnya dimanfaatkan sebagai sumber asupan asam lemak bagi tubuh. Dengan ikan lemuru sebanyak 100kg akan diperoleh minyak ikan lemuru sebanyak 20kg. Limbah dari minyak ikan lemuru masih mengandung asam lemak tidak jenuh ganda omega-3 yang sangat tinggi masih banyak masyarakat yang memanfaatkannya kembali. Menurut Rusmana (2010), minyak ikan lemuru merupakan minyak limbah pengolahan ikan lemuru yang mempunyai kandungan ikan sebanyak 4,5 – 11,8 %.

Minyak ikan lebih banyak mengandung asam lemak tak jenuh jamak atau *polyunsaturated fatty acids* (PUFA). Asam lemak tak jenuh jamak yang banyak terdapat pada ikan adalah asam lemak omega-3, terutama eikosapentanoat/EPA (C20:5, n-3) dan asam dokosaheksanoat/DHA (Irianto, 1993).

2.5 Antioksidan

Antioksidan adalah bahan yang digunakan untuk mencegah oksidasi lemak, misalnya digunakan pada bahan pangan yang akan digoreng, makanan dari biji-bijian, dan makanan-makanan lain yang mengandung banyak lemak dan mudah tengik (Winarno, 1980).

Berdasarkan aktivitasnya, antioksidan dapat dibedakan menjadi antioksidan primer dan sekunder. Antioksidan primer adalah suatu zat yang dapat menghentikan reaksi berantai pembentukan radikal yang melepaskan hidrogen. Zat - zat yang termasuk golongan ini dapat berasal dari alam dan dapat pula buatan.

Antioksidan alam antara lain *tokoferol, lesitin, fosfatida, sesamol, gosipol,* dan asam askorbat. Antioksidan alam yang paling banyak ditemukan dalam minyak nabati adalah tokoferol yang mempunyai keaktifan vitamin E. Tokoferol ini mempunyai ikatan rangkap yang mudah dioksidasi sehingga akan melindungi lemak dari oksidasi. Antioksidan buatan ditambahkan ke dalam lemak atau bahan pangan untuk mencegah ketengikan. Antioksidan buatan yang banyak digunakan adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya agak beracun. Empat macam antioksidan buatan yang sering digunakan adalah *Butylated hidroxyanisole (BHA), Butylated hidroxytoluene (BHT), Propylgallate (PG), Nordihidroguairitic Acid (NDGA).* Kombinasi beberapa antioksidan sintetik menimbulkan sinergisme. BHA yang dikombinasi dengan PG akan lebih efektif dari pada digunakan secara terpisah, tetapi kombinasi BHT dengan PG menimbulkan sinergisme negatif (Winarno 1992).

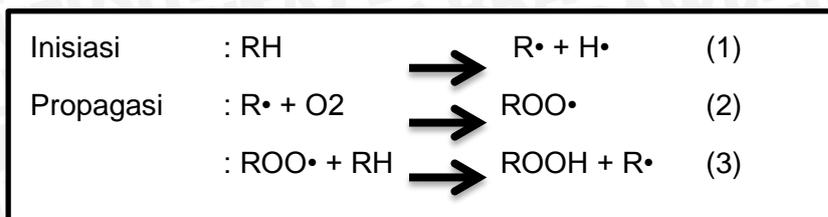
2.5.1 Fungsi Antioksidan

Menurut Kunchahyo (2007), fungsi utama antioksidan digunakan sebagai upaya untuk memperkecil terjadinya proses oksidasi dari lemak dan minyak , memperkecil terjadinya lemak dan minyak , memperkecil terjadinya kerusakan dalam makanan, memperpanjang masa pemakaian dalam industri makanan, meningkatkan stabilitas lemak yang terkandung dalam makanan serta mencegah hilangnya kualitas sensori dan nutrisi.

Antioksidan digunakan untuk melindungi komponen-komponen makanan yang bersifat tidak jenuh (mempunyai ikatan rangkap), terutama lemak dan minyak. Antioksidan dapat pula digunakan untuk melindungi komponen-komponen lain seperti vitamin dan pigmen, yang juga banyak mengandung ikatan rangkap dalam strukturnya (Siagian, 2002). Musthafa dan Lawrence (2000) menambahkan bahwa antioksidan juga pada akhirnya berfungsi untuk menetralsisir atau meredam dampak negatif dari radikal bebas.

Antioksidan yang baik akan bereaksi dengan radikal bebas segera setelah senyawa tersebut terbentuk. Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh 4 macam mekanisme reaksi (Ketaren, 1986), yaitu (1) pelepasan hidrogen dari antioksidan, (2) pelepasan elektron dari antioksidan, (3) addisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan, dan (4) pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan.

Mekanisme kerja antioksidan pada umumnya dapat dimengerti setelah mekanisme proses oksidasi lemak dalam bahan makanan atau pada sistem biologis dipahami dengan baik. Oksidasi lemak terdiri atas 3 tahapan utama, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Pembentukan radikal asam lemak, yaitu suatu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen, terjadi pada tahap inisiasi (1). Tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksi (2). Radikal peroksi lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidrogen peroksida dan radikal asam lemak baru (3) (Siagin, 2002). Reaksi inisiasi dan propagasi dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3. Reaksi inisiasi dan propagasi
(Sumber: Siagian, 2002)**

Antioksidan dibagi menjadi 4 tipe berdasarkan fungsinya (Siagian 2002; Hariyatmi 2004), yaitu:

- Tipe pemutus rantai reaksi pembentuk radikal bebas, dengan cara menyumbangkan atom H, contohnya vitamin E.
- Tipe pereduksi yang mampu mentransfer atom H atau oksigen dan bersifat pemulung, contohnya vitamin C.
- Tipe pengikat logam yang mampu mengikat zat prooksidan (Fe²⁺ dan Cu²⁺), contohnya flavonoid, asam sitrat dan EDTA.
- Antioksidan seluler yang mampu mendekomposisi hidrogen peroksida menjadi bentuk stabil, contohnya pada manusia dikenal SOD, katalase, glutathion peroksidase.

Antioksidan umumnya ditambahkan pada lemak, minyak, atau makanan yang banyak mengandung lemak. Penambahan ini bertujuan untuk mencegah terjadinya ketengikan pada makanan. Penyebab ketengikan pada lemak atau minyak tersebut adalah senyawa-senyawa yang merupakan produk akhir dari reaksi autooksidasi. Reaksi autooksidasi merupakan suatu reaksi berantai dimana inisiator dan propagatornya adalah radikal bebas (Rita *et al.* 2009).

Pembentukan radikal bebas ini dapat dipengaruhi oleh faktor-faktor yang dapat mempercepat reaksi, seperti cahaya, panas, peroksida lemak atau hidrogen peroksida, logam-logam berat (Cu, Fe, Co, dan Mn), logam porfirin (*hematin, hemoglobin, mioglobin, dan klorofil*), serta enzim-enzim lipoksidase

(Winarno, 2008). Penghilangan atau deaktivasi radikal bebas asam lemak maupun radikal bebas peroksi akan menghentikan atau memutuskan reaksi oksidasi yang terjadi pada tahap awal. Hal ini diharapkan akan memperlambat pembentukan senyawa-senyawa yang dapat menimbulkan ketengikan (Rita *et al.*, 2009).

Antioksidan sebaiknya ditambahkan ke lipid seawal mungkin untuk menghasilkan efek maksimum. Antioksidan hanya akan benar-benar efektif bila ditambahkan seawal mungkin selama periode induksi, yaitu suasana periode awal oksidasi lipid terjadi dimana oksidasi masih berjalan secara lambat dengan kecepatan seragam (Trilaksani, 2003).

2.5.2 Uji aktivitas antioksidan (Uji DPPH)

Adanya senyawa antioksidan dapat diketahui melalui uji aktivitas antioksidan. Prinsipnya adalah evaluasi terhadap adanya aktivitas penghambatan proses oksidasi oleh senyawa-senyawa antioksidan yang terdapat dalam bahan pangan atau contoh ekstrak bahan alam.

Metode yang umum dipakai adalah dengan menggunakan radikal bebas *diphenyl-picrylhydrazyl* (DPPH) yang nantinya akan bereaksi dengan senyawa antioksidan menghasilkan *diphenylpicrylhydrazine* (non radikal) yang diindikasikan dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat (Molyneux, 2004). DPPH adalah radikal bebas yang bersifat stabil dan beraktivitas dengan cara mendelokalisasi elektron bebas pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain. Proses delokalisasi ini ditunjukkan dengan adanya warna ungu (violet) pekat yang dapat dikarakterisasi pada pita absorbansi dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 520 nm (Molyneux, 2004). Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan

menyebabkan warna DPPH dari ungu menjadi kuning yang diukur pada panjang gelombang 517 nm.

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode DPPH adalah IC50 (*inhibition concentration*). IC50 merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50 % (Molyneux, 2004).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu cara untuk mendapatkan zat – zat berkhasiat atau zat – zat aktif dengan cara menariknya dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Ditjen POM, 1986).

Ada beberapa cara ekstraksi diantaranya adalah ekstraksi secara refluks, ekstraksi secara sonikasi dan maserasi. Ekstraksi secara refluks membutuhkan peralatan khusus, waktu yang relatif lama, energi dan bahan kimia yang cukup banyak, sehingga diperlukan alternatif ekstraksi yang lebih sederhana, cepat, efisien dan tidak mahal, namun tetap memenuhi kaidah – kaidah analisis. Ekstraksi secara sonikasi sangat tepat diterapkan pada analisa dalam jumlah massif dengan waktu yang terbatas. Sedangkan maserasi merupakan cara yang sangat sederhana dan tidak membutuhkan peralatan khusus sehingga dapat diterapkan di semua laboratorium (Mujahid *et al.*, 2011).

Selain caranya yang sederhana dan tidak membutuhkan peralatan khusus, maserasi juga memiliki kekurangan. Menurut Depkes RI (2000), Kekurangannya adalah pengerjaannya yang lama karena adanya penambahan pelarut untuk penyarian ekstrak pertama dan seterusnya. Kemudian penarikan

terhadap kandungan senyawa suatu bahan tidak sempurna karena prinsip kerjanya adalah pencapaian keseimbangan konsentrasi.

Tahap – tahap pencapaian keseimbangan konsentrasi adalah pelarut akan melarutkan kandungan simplisia dari suatu bahan. Pada waktu yang sama akan terjadi proses difusi antara bahan dengan pelarut sampai keduanya mencapai konsentrasi yang seimbang. Keseimbangan konsentrasi ini menandakan proses difusi sudah berakhir dan senyawa dalam bahan sudah masuk kedalam pelarut. Agar keseimbangan konsentrasi lebih cepat tercapai maka sesekali perlu dilakukan pengocokan atau pengadukan (Istiqomah, 2013).

Beberapa tahap maserasi yaitu memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat yang cocok ke dalam bejana, kemudian dituangi dengan penyari 75 bagian, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali setiap hari lalu diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan penyari. Penyarian diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak bercahaya, setelah dua hari lalu endapan dipisahkan (Harborne, 1987).

2.7 Kromatografi Kolom

Prinsip kerja kromatografi kolom ialah kolom pemisahan diisi dengan penyerap zat padat seperti alumunia (fase tetap) dan dialiri dengan pelarut seperti benzena (fase bergerak) (Sastroharmidjo, 1985). Pemisahan komponen secara kromatografi kolom dapat dilakukan dalam suatu kolom yang didisi dengan fase stasioner dan cairan (pereaksi) sebagai fase gerak untuk mengetahui banyaknya komponen sampel yang keluar melalui kolom (Adnan, 1997).

Kromatografi kolom termasuk kromatografi cairan, adalah metode pemisahan yang cukup baik untuk sampel lebih dari 1 gram. Pada kromatografi

ini sampel sebagai lapisan terpisah diletakkan diatas fase diam. Biasanya sampel dihomogenkan dengan fase diam sehingga merupakan serbuk kering, diatas lapisan ini dapat diletakkan pasir untuk menjaga tidak terjadinya kerusakan waktu ditambahkan fase gerak diatas lapisan sampel. Fase diam dan sampel ini berada di dalam kolom yang biasanya dibuat dari gelas, logam ataupun plastik. Selama elusi fase gerak dialirkan dari atas, mengalir karena gaya gravitasi atau ditekan dan juga disedot dari arah bawa. Komponen sampel akan terpisah selama bergerak dibawa fase gerak didalam kolom (fase diam). Komponen yang paling tidak tertahan oleh fase diam akan keluar lebih dahulu dan diikuti oleh komponen lain. Semuanya ditampung sebagai fraksi, volume tiap fraksi tergantung besarnya sampel (kolom). (Sugara, 2010).

2.8 Identifikasi Senyawa Antioksidan

2.8.1 Spektrofotometer *Ultraviolet Visible* (UV-VIS)

Spektrofotometri Sinar Tampak (UV-Vis) adalah pengukuran energi cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

Menurut Sarstroharmijodjo (1991), spektrofotometri merupakan salah satu metode dalam kimia analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu

sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Peralatan yang digunakan dalam spektrofotometri disebut spektrofotometer. Cahaya yang dimaksud dapat berupa cahaya visibel, UV dan inframerah, sedangkan materi dapat berupa atom dan molekul namun yang lebih berperan adalah elektron valensi.

2.8.2 *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS)*

Menurut Maryam (2007), *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry* adalah dua alat yang digabungkan menjadi satu, yang berfungsi untuk memisahkan beberapa senyawa atau campuran senyawa berdasarkan kepolarannya (prinsip kerja kromatografi), dimana setelah campuran senyawa tersebut terpisah, maka senyawa yang murni akan diidentifikasi berat molekulnya. Data yang didapatkan adalah berat molekul ditambah beberapa muatan dan berat molekul pelarut. Adapun cara kerja *liquid chromatography* adalah sama dengan HPLC atau *liquid chromatography* lain, adalah :

- a. Analit bersama dengan *eluen* dari *syringe pump* atau LC masuk ke dalam *capillary*. Di dalam *capillary* terdapat anoda (kutub negatif) pada *taylor cone* dan katoda (kutub positif) di dekat masukan analit dan *eluen*. Kutub ini berfungsi agar muatan yang berkumpul pada *taylor cone* adalah muatan positif sehingga nantinya saat terjadi penyemprotan dan terbentuk droplet (tetes – tetes) tidak bergabung – gabung menjadi droplet yang lebih besar lagi.
- b. *Analit dan solven (eluen)* disemprotkan melalui *taylor cone*. Akan terbentuk droplet – droplet dimana droplet – droplet itu akan mengalami tahap evaporasi solven untuk mengurangi solven yang menempel di analit. Karena suatu saat, apabila terjadi evaporasi secara terus menerus maka solven yang meliputi analit terkungkung dalam muatan positif yang berlebih, dalam bahasa Inggris tahap

seperti ini disebut *the 'rayleigh' limit is reached*, maka akan terjadi *explosion* yang disebut *coulombic explosion* dimana akan terjadi pemecahan droplet (tetesan) tadi. Ada beberapa kemungkinan yang terjadi pada droplet – droplet tersebut, yaitu :1) analit akan ditambahi satu muatan positif, 2) analit akan ditambahi beberapa muatan positif, 3) analit akan ditambahi satu muatan positif dan satu molekul solven, 4) analit akan ditambahi satu muatan positif dan beberapa molekul solven, 5) analit akan ditambahi beberapa muatan positif dan beberapa molekul solven.

c. Droplet yang mengalami coulombic explosion tersebut akan masuk ke dalam cone dimana di sisi kiri dan kanannya sudah mengalir gas Nitrogen (N₂). Gas ini berfungsi agar analit yang terjadi tadi stabil dalam bentuknya dan tidak terganggu oleh pengaruh gas oksigen. Droplet masuk ke dalam capillary transfer lalu akan dianalisis melalui *mass spectrometer*.

Kelebihan LC-MS menurut Vogeser dan Cristoph (2008), antara lain : (a) spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik yang diperoleh dari penggunaan spektrometer massa detektor. (b) Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GCMS sebagai spektrometer yang klasik, penerapan LC-MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul dibawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivitasi. (c) Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. (d) Kaya informasi. Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.