

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 ALGA HIJAU

Kelompok ini merupakan kelompok dengan vegetasi terbesar dibanding kelompok lainnya. Chlorophyceae disebut juga alga hijau yang tergolong ke dalam divisi Chlorophyta. Sel-selnya memiliki kloroplas yang berwarna hijau yang jelas seperti pada tumbuhan tingkat tinggi karena mengandung pigmen klorofil a dan b, karotenoid. Pada kloroplas terdapat pirenoid, hasil asimilasi berupa tepung dan lemak. Perkembangbiakan terjadi secara aseksual dan seksual. Secara aseksual dengan membentuk zoospora, sedangkan secara seksual dengan anisogami. Chlorophyceae terdiri atas sel-sel kecil yang merupakan koloni berbentuk benang bercabang-cabang atau tidak, dan menyerupai kormus tumbuhan tingkat tinggi (Tjitrosoepomo, 1994).

Alga hijau adalah kelompok alga yang paling maju dan memiliki banyak sifat-sifat tanaman tingkat tinggi. Kelompok ini adalah organisme prokariotik dan memiliki struktur-struktur sel khusus yang dimiliki sebagian besar alga. Mereka memiliki kloroplast, DNA-nya berada dalam sebuah nukleus, dan beberapa jenisnya memiliki flagella. Dinding sel alga hijau sebagian besar berupa selulosa, meskipun ada beberapa yang tidak mempunyai dinding sel. Mereka mempunyai klorofil a dan beberapa karotenoid, dan biasanya mereka berwarna hijau rumput. Pada saat kondisi budidaya menjadi padat dan cahaya terbatas, sel akan memproduksi lebih banyak klorofil dan menjadi hijau gelap. Kebanyakan alga hijau menyimpan zat tepung sebagai cadangan makanan meskipun ada diantaranya menyimpan minyak atau lemak. Pada umumnya unicel merupakan sumber makanan dalam budidaya dan filamen-filamennya merupakan organisme pengganggu (Ugwu, et al., 2007).

2.2 Caulerpa Rasemosa

Caulerpa racemosa tumbuh bergerombol atau berumpun oleh karena itu sering disebut sebagai anggur laut. Keberadaannya dapat dijumpai di paparan terumbu karang dengan kedalaman hingga 200 m. Sebagai fitobentik, tumbuhan ini hidup menancap atau menempel di substrat dasar perairan laut seperti karang mati, fragmen karang, pasir dan lumpur. Pertumbuhannya bersifat epifitik atau saprofitik dan kadang-kadang berasosiasi dengan tumbuhan laut (Atmadja *et al.* 1996).

Klasifikasi rumput laut *Caulerpa racemosa* menurut Sedjati (1999) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Chlorophyta
Classis	: Chlorophyceae
Ordo	: Caulerpales
Familia	: Caulerpaceae
Genus	: <i>Caulerpa</i>
Species	: <u><i>Caulerpa racemosa</i></u>



Gambar 1. *Caulerpa Rasemosa*
(Sumber : Dokumentasi, 2014).

2.3 Komposisi Kimia *Cauplerpa Rasemosa*

Caulerpa ini mempunyai kandungan gizi yang cukup tinggi sebagai sumber protein nabati, mineral maupun vitamin. Kandungan gizi alga *C. racemosa* dari pesisir pantai Arowi Manokwari, memiliki kadar air 37,37 %, abu 30,31 %, protein 6,63 %, lemak 2,09 %, karbohidrat 23,63 %, kadar serat

9,94 % serta memiliki kadar kalsium sebagai salah satu mineral makro sebesar 1,766 % (Selfanie t, *et al.*, 2011).

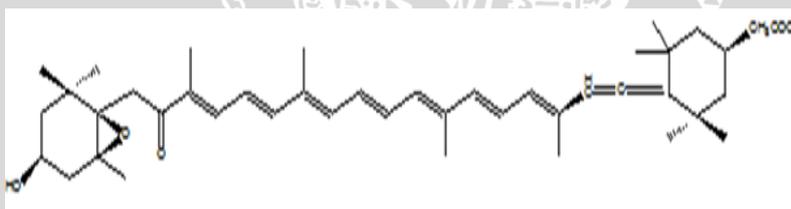
Tabel 1. Komposisi kimia *Caulerpa racemosa* segar per 100 gr

Senyawa	Kadar (%)
Kadar abu	2,1 ± 0,2
Kadar air	88,8 ± 0,5
Kadar protein	1,5 ± 0,2
Kadar lemak	0,5 ± 0,1
Kadar serat	7,3 ± 0,5

Sumber : Santoso *et al.* (2006)

2.4 Fukosantin

Fukosantin memiliki rumus bangun $C_{42}H_{58}O_6$, berwarna orange dan memiliki tujuh ikatan rangkap. Fukosantin dapat melindungi tubuh dan mencegah berbagai penyakit, menghambat pertumbuhan sel kanker, mencegah serangan jantung, dan lain-lain (Ardhian. E. A, *et al.*, 2013).



Gambar 2. Struktur rumus bangun fukosantin (Peng *et al.*, 2011)

Struktur kimia pada fukosantin ini tergolong unik dan tidak biasa karena memiliki sebuah ikatan alenat dan 5,6-monoepoksida di dalam molekulnya. Fukosantin memiliki sifat labil pada kondisi lingkungan basa. Oleh karena itu, perlu diperhatikan saat mengekstraksi pigmen ini, lingkungan basa harus dihindari (Nurcahyanti & Timotius, 2007).

2.5 Manfaat Fukosantin

Fukosantin juga dapat digunakan sebagai antiobesitas, antidiabetes dan dapat meningkatkan DHA (Docosahexaenoic acid) di hati. DHA merupakan komponen bioaktif yang efektif mengurangi resiko penyakit kardiovaskular yang disebabkan oleh obesitas dan diabetes (Maeda, *et al.*, 2008).

Menurut Mise & Yasumoto (2011) bahwa penambahan fukosantin dengan obat antikanker cisplatin yang bekerjasama mampu menekan perkembangbiakan dari sel kanker selama proses kemoterapi. Fukosantin juga tidak memberikan pengaruh dari efektivitas dari obat kanker cisplatin itu sendiri, sehingga karotenoid jenis ini sangat dianjurkan untuk ditambahkan pada pasien kanker yang sedang dikemoterapi.

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu cara pemisahan yang paling banyak digunakan untuk menarik atau memisahkan komponen bioaktif dari rumput laut karena lebih mudah dan sederhana. Ekstraksi adalah suatu proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan dengan menggunakan pelarut yang dipilih sehingga komponen yang diinginkan dapat larut (Ansel 1989). Ditambahkan oleh (Sudarmadji *et al.*, 1989), pemilihan pelarut yang akan dipakai dalam proses ekstraksi harus memperhatikan sifat kandungan senyawa yang akan diisolasi misalnya polaritas. Pada prinsipnya suatu bahan akan mudah larut dalam pelarut yang sama polaritasnya.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi, karena cara ini merupakan metode yang mudah dilakukan dan menggunakan alat-alat sederhana, cukup dengan merendam sampel dalam pelarut. Pelarut yang digunakan adalah etanol karena pelarut ini dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar.

Etanol mudah menguap, sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak. Semua filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sehingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) (Sri Marhaeni J, *et al.*, 2009).

2.7 Pelarut

Pelarut merupakan faktor yang menentukan hasil ekstraksi sehingga merupakan salah satu faktor yang menentukan sehingga dalam pemilihan pelarut harus diperhatikan. pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan serta mempunyai kelarutan yang besar (Guenther, 1987)

Sastrohamidjojo (2001), menyatakan bahwa pemilihan pertama dari pelarut ialah bagaimana sifat kelarutannya. Tetapi sering lebih baik untuk memilih suatu pelarut yang tak tergantung daripada kekuatan elusi sehingga zat – zat elusi yang lebih kuat dapat dicoba.

Menurut Sembiring, *et al.*, (2006), Prinsip maserasi ialah dengan pengambilan zat aktif yang dilakukan dengan cara merendam dalam cairan penyari yang sesuai selama tiga hari pada temperatur kamar terlindung dari cahaya, cairan penyari akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel. Larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh cairan penyari dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan dan penggantian cairan penyari setiap hari. Endapan yang diperoleh dipisahkan dan filtratnya dipisahkan

2.7.1 Metanol

Metanol merupakan cairan polar yang dapat bercampur dengan air, alkohol-alkohol lain, ester, keton, eter, dan sebagian besar pelarut organik.

Metanol sedikit larut dalam lemak dan minyak. Secara fisika metanol mempunyai afinitas khusus terhadap karbon dioksida dan hidrogen sulfida. Titik didih metanol berada pada 64,7° C dengan panas pembentukan (cairan) -239,03 kJ/mol pada suhu 25°C (Anozie dan Bakare, 2004).

Tabel 2. Sifat-sifat Metanol

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu, dan karbinol
2.	Rumus Bangun	CH_3OH $\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	-97°C
5.	Titik didih	64.7°C
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	0,7918 g/cm ³ , cair
8.	Titik nyala	11°C
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Romiyanto (2014).

Metanol merupakan salah satu bahan kimia industri yang penting Sebagai bahan kimia industri, metanol telah digunakan secara luas untuk produksi berbagai bahan kimia yang lain. Sekitar sepertiga dari produksi methanol digunakan untuk membuat formaldehida dan selebihnya digunakan untuk pembuatan MTBE (Methyl Tertiary Buthyl Eter), asam asetat, pelarut, metaklirat, bahan bakar, dan lain-lain. Sementara itu, formaldehida yang ditemukan oleh Butlerov pada tahun 1859 adalah suatu senyawa yang dapat bereaksi dengan hampir semua senyawa kimia baik organik maupun anorganik. Penggunaan terbesar formaldehida adalah sebagai bahan dasar pembuatan resin-resin formaldehida seperti urea formaldehida, melamin formaldehida, dan fenol formaldehida (Kirk dan Othmer, 1994)

2.7.2 Aseton

Menurut Suhartono, J., Hendri M. A., dan Sumarno, (1998), Aseton, juga dikenal sebagai propanon, dimetil keton, 2-propanon, propan-2-on, dimetilformaldehida, dan β -ketopropana, adalah senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aseton dapat digunakan untuk mengaktifkan karbon arang dari batok kelapa. Carbon dari proses carbonasi batok kelapa yang merupakan bahan penutup porinya adalah tar, akan diekstraksi dengan dikontakkan dengan aseton. Karakteristik aseton itu sendiri adalah:

1. Rumus molekul : CH_3COCH_3
2. Berat molekul : 50,1 kg/mol
3. Melting point : - 94,6 oC
4. Spesifik gravity : 0,7863 (25 oC)

Sedangkan menurut Widjayanti (2009), Aseton mempunyai nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter dan piroasetis spirit. Rumus molekul dari aseton adalah CH_3COCH_3 . Aseton biasa digunakan sebagai pelarut karena mempunyai sifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Kegunaan aseton antara lain adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, parfum, pembersih, bahan campuran resin dan lain sebagainya.

Aseton memiliki nama lain dimetil asetat, dimetil keton, ketopropan, metilasetil, propanon, piroasetat eter, dan piroasetis spirit. Fungsi utama dari aseton adalah sebagai pelarut, karena bersifat higroskopis, sangat volatil, tidak beresidu dan mudah terbakar. Selain itu kegunaan lain dari aseton adalah sebagai pelarut senyawa asetilen, campuran adesif, campuran parfum, campuran pembersih, dan campuran resin (Romiyanto, 2014).

2.7.3 Dietil Eter

Dietil Eter merupakan salah satu dari eter komersial yang paling penting diantara eter yang lainnya. Dalam dietil eter banyak digunakan sebagai bahan pelarut untuk melakukan reaksi-reaksi organik dan memisahkan senyawa organik dari sumber alamnya. Penggunaan sebagai pelarut diantaranya untuk pelarut minyak, lemak, getah, resin, mikroselulosa, parfum, alkaloid. Dalam dunia kedokteran dietil eter sangat identik sebagai bahan anestesi (Ulmann, 1987).

Eter adalah senyawa tak berwarna dengan bau enak yang khas. Titik didihnya rendah dibanding alkohol dengan jumlah atom karbon yang sama, dan kenyataannya mempunyai titik didih sama dengan hidrokarbon, dimana pada eter gugus $-CH_2-$ digantikan oleh oksigen. DiEtil Eter mempunyai rumus bangun sebagai berikut $CH_3CH_2-O-CH_2CH_3$. (Fessenden and Fessenden, 1997). Sifat fisik dari dietil eter dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Sifat fisik Dietil Eter

Jenis Pelarut	Dietil eter
Titik Didih ($^{\circ}C$)	35
Titik Beku ($^{\circ}C$)	-116
Konstanta dielektrik	4,3

Sumber: Yanti (2008)

2.7.4 Etil Asetat

Etil asetat dengan rumus molekul ($CH_3COOC_2H_5$) adalah salah satu bahan kimia yang digunakan sebagai bahan pelarut terutama dalam farmasi dan kosmetik (Dian R.S dan Marlina I.S, 2013). Ditambahkan oleh (Reskika, 2011), Etil asetat adalah pelarut polar menengah (semi-polar) bersifat volatil yang memiliki indeks polaritas sebesar 4,4 .

Menurut Romiyanto (2014), etil asetat merupakan senyawa hasil ester dari etanol dan asam asetat. Etil asetat berupa zat cair dan tidak berwarna serta

beraroma khas. Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang mudah menguap, tidak beracun dan tidak higroskopis.

Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan yang tak berwarna, memiliki aroma khas. Senyawa ini sering disingkat EtOAc, dengan Et mewakili gugus etil dan Oac mewakili asetat. Etil asetat adalah pelarut yang baik digunakan untuk proses ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas yang rendah. Etil asetat yang merupakan pelarut semi polar dapat menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga nonpolar (Putri et.,al 2010).

2.7.5 Heksan

Sifat fisik dari n- heksana ialah berbentuk cair, jernih atau tidak berwarna, berbau seperti gasoline, bersifat kelarutan tidak larut dalam air dan lebih mudah terlarut dalam organik, tekanan uap 151 mmHg, nilai viskositas 0,31 mPa.s, titik didih (760 mmHg) pada suhu 62^oc – 69^oc, titik beku -95^oc, dan nilai kelarutan (20^oc) 0,1 g/L (Abdullah dan Widiwati, 2010).

Menurut (Jos, B., 2004), heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C₆H₁₄ (isomer utama n-heksana memiliki rumus CH₃(CH₂)₄CH₃. Awalan heks- merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada heksana dan akhiran -ana berasal dari alkana, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. N Hexana merupakan jenis pelarut non polar. Karakteristik n – heksana :

1. Nama lain : caproyl hydride, hexyl hydride
2. Rumus molekul : CH₃(CH₂)₄CH₃
3. Berat molekul : 86,17 kg/mol
4. Warna : berwarna bening

5. Melting point : - 94 oC
6. Boiling point : 69 (P = 1 atm)
7. Spesific gravity : 0,659
8. Kelarutan dalam 100 bagian air : 0,014 (15⁰c)

2.8 Fraksinasi

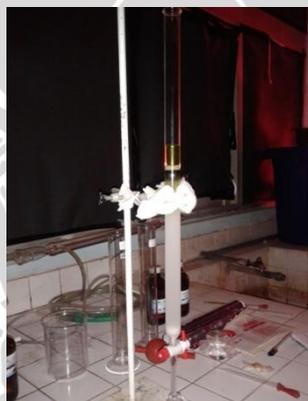
Fraksinasi adalah proses pemisahan suatu kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Pembagian atau pemisahan ini didasarkan pada bobot dari tiap fraksi, fraksi yang lebih berat akan berada paling dasar sedang fraksi yang lebih ringan akan berada diatas. Fraksinasi bertingkat biasanya menggunakan pelarut organik seperti eter, aseton, etanol, diklorometana, atau campuran pelarut tersebut. Asam lemak, asam resin, lilin, dan zat warna adalah bahan yang penting dan dapat diekstraksi dengan pelarut organik (Adjuwana dan Nur 1989).

Fraksinasi merupakan proses pemisahan antara zat cair dengan zat cair. Fraksinasi dilakukan secara bertingkat berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu dari non polar, semi polar, dan polar. Senyawa yang memiliki sifat non polar akan larut dalam pelarut non polar, yang semi polar akan larut dalam pelarut semi polar, dan yang bersifat polar akan larut kedalam pelarut polar (Harborne 1987).

2.9 Kromatografi Kolom

Untuk memisahkan campuran dengan metode kromatografi kolom, kolom yang telah dipilih sesuai campuran diisi dengan bahan penyerap seperti alumina dalam keadaan kering atau dibuat seperti bubuk dengan pelarut. Pengisian harus dilakukan secara hat-hati dan sepadat mungkin agar rata sehingga terhindar dari gelembung-gelembung udara, untuk membantu homogenitas biasanya kolom setelah diisi divibrasi diketok-ketok. Sejumlah

cuplikan yang dilarutkan dalam sedikit pelarut, dituangkan melalui sebelah atas kolom dan dibiarkan mengalir ke dalam adsorben. Komponen-komponen dalam campuran diadsorpsi dari larutan secara kuantitatif oleh bahan penyerap berupa pita sempit pada permukaan atas kolom. Dengan penambahan pelarut secara terus-menerus, masing-masing komponen akan bergerak turun melalui kolom dan pada bagian atas kolom akan terjadi kesetimbangan baru antara bahan penyerap, komponen campuran dan eluen. Kesetimbangan dikatakan tetap apabila suatu komponen yang satu dengan yang lainnya bergerak ke bagian bawah kolom dengan waktu atau kecepatan berbeda-beda sehingga terjadi pemisahan (Yazid, 2005, hal: 200-2001).



Gambar 3. Kromatografi Kolom
(Sumber : Dokumentasi, 2014).

Pemisahan komponen campuran akan melalui kromatografi adsorpsi tergantung pada kesetimbangan adsorpsi-desorpsi antara senyawa yang teradsorb pada permukaan dari fase diam padatan dan pelarut dalam fase cair. Tingkat adsorpsi komponen tergantung pada polaritas molekul, aktivitas adsorben, dan polaritas fase gerak cair. Senyawa dengan gugus fungsional lebih polar akan teradsorb lebih kuat pada permukaan fase padatan. Aktivitas adsorben tergantung komposisi kimianya, ukuran partikel, dan pori-pori partikel (Braithwaite and Smith, 1995).

Menurut Hayani (2007), untuk pengisian kolom, pada bagian paling bawah kolom dimasukkan sedikit kapas, wol kaca dan pasir laut, kemudian dimasukkan bubuk silica gel 70-230 mesh sampai mencapai tiga perempat tinggi kolom sambil di aduk agar tidak ada rongga udara di tengah-tengah kolom. Untuk pemisahan komponen, mula-mula dialirkan ekstrak cair ke dalam kolom kromatografi, kemudian kran dibuka sehingga ekstrak akan meresap ke dalam silica gel sampai batas atas silica gel di dalam kolom. Setelah itu dimasukkan pereaksi terus-menerus sambil kran kolom dibuka sedikit. Fraksi yang terpisah ditampung pada tabung reaksi sampai seluruh ekstrak terpisahkan.

2.10 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

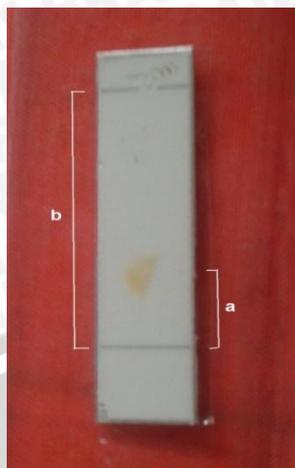
Penggunaan umum KLT adalah untuk menentukan banyaknya komponen dalam campuran, identifikasi senyawa, memantau berjalannya suatu reaksi, menentukan efektivitas pemurnian, menentukan kondisi yang sesuai untuk kromatografi kolom, serta memantau kromatografi kolom, melakukan screening sampel untuk obat. Analisa kualitatif dengan KLT dapat dilakukan untuk uji identifikasi senyawa baku. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai R_f . Analisis kuantitatif dilakukan dengan 2 cara, yaitu mengukur bercak langsung pada lempeng dengan menggunakan ukuran luas atau dengan teknik densitometry dan cara berikutnya adalah dengan mengerok bercak lalu menetapkan kadar senyawa yang terdapat dalam bercak dengan metode analisis yang lain, misalnya dengan metode spektrofotometri. Dan untuk analisis preparatif, sampel yang ditotolkan dalam lempeng dengan lapisan yang besar lalu dikembangkan dan dideteksi dengan cara yang non- destruktif. Bercak yang mengandung analit yang dituju selanjutnya dikerok dan dilakukan analisis lanjutan (Gholib Gandjar, 2007).

Teknik ini dikembangkan tahun 1938 oleh Ismailoff dan Schraiber. Adsorben dilapiskan lempeng kaca yang bertindak sebagai fase diam. Fase bergerak akan merayap sepanjang fase diam dan terbentuklah kromatogram. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif. Kecepatan pemisahan tinggi dan mudah untuk memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan (Khopkar, 1990).

Menurut Daintith (2004), pada proses KLT, sebelum pertama dibuat sebuah garis batas di dekat bagian dasar plat KLT, kemudian sampel campuran ditotolkan pada garis tersebut. Plat diletakkan dalam posisi berdiri di dalam pelarut yang akan merambat ke atas melewati garis batas dengan daya kapilaritas. Beberapa komponen akan melekat lebih kuat pada fase gerak dan bergerak ke atas secara lambat sehingga fraksi yang berbeda di dalam campuran akan terpisah. Ketika pelarut hampir mencapai ujung plat, secepat mungkin plat diambil dan dikeringkan. Ditambahkan oleh Hidayati (2013), Bercak yang terdeteksi kemudian ditandai dan dihitung nilai *retardation factor* (Rf)-nya. Nilai Rf yang menunjukkan ukuran kecepatan migrasi senyawa kromatografi diperoleh dengan membandingkan antara jarak bercak dari titik awal penotolan dengan jarak yang ditempuh oleh fase gerak.

Menurut Hijaz (2009), rumus untuk menentukan nilai Rf sebagai berikut :

$$\text{Harga Rf} = \frac{\text{jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$



Keterangan :
a. Jarak tempuh senyawa
b. Jarak tempuh pelarut

**Gambar 4. Kromatografi Lapis Tipis
(Sumber : Dokumentasi, 2014).**

2.11 Spektrofotometer UV-Vis

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. Kemudahan metode ini adalah dapat digunakan baik untuk sample berwarna juga untuk sample tak berwarna (Riyadi, 2009).

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 di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Dachriyanus, 2004).

Menurut Triyati (1985), prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis ialah berdasarkan penyerapan cahaya atau energi radiasi oleh suatu larutan yang diuji. Cahaya yang bersifat polikromatis (mempunyai banyak warna) dari sumber

cahaya dipancarkan menuju monokromator yang akan menguraikan sinar tersebut menjadi cahaya monokromatis (tunggal) dengan pita-pita panjang gelombang yang dapat digunakan sebagai pengukuran suatu zat tertentu. Cahaya atau energi radiasi dari monokromator dipancarkan pada suatu larutan sampel dengan konsentrasi tertentu di dalam kuvet, sehingga ada cahaya yang diserap dan ada pula yang diteruskan. Cahaya yang diserap sebanding dengan konsentrasi larutan sampel, sehingga akan diketahui konsentrasi zat di dalam sampel secara kuantitatif. Jumlah cahaya yang diserap oleh larutan akan menghasilkan sinyal elektrik pada detektor dan diterjemahkan ke dalam bentuk angka-angka oleh pencatat (reader).

Menurut Sudarman (2012), rumus perhitungan spektrofotometer sebagai berikut :

$$A = \epsilon b c$$

Keterangan:

- A = Absorbansi
- ϵ = Absorptivitas Molar (*Molar extinction coefficient*)
- b = Tebal Tempat Komponen
- c = Konsentrasi Komponen



Gambar 5 . Spektrofotometer UV-Vis
(Sumber : Dokumentasi, 2014).

2.12 Reaksi DPPH dan Radikal Bebas

DPPH memiliki ciri-ciri berupa padatan berwarna ungu kehitaman, larut dalam pelarut DMF atau etanol / metanol, titik didih 127–129°C, panjang gelombang maksimal DPPH adalah 517 nm, berat molekul 394,3 g/mol, dan DPPH memiliki rumus molekul $C_{18}H_{12}N_5O_6$ (Hijaz, 2009). 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).

Menurut Osawa (1981), dalam uji DPPH, kemampuan scavenging terhadap DPPH dilakukan dengan mengamati penurunan absorbansi pada 515-517 nm. Penurunan absorbansi dapat terjadi karena penambahan elektron dari senyawa antioksidan pada elektron yang tidak berpasangan pada gugus nitrogen dalam struktur senyawa DPPH. Larutan DPPH berwarna ungu. Intensitas warna ungu ini akan menurun ketika radikal DPPH tersebut berikatan dengan hidrogen. Semakin kuat aktivitas antioksidan sampel maka akan semakin besar juga penurunan intensitas warna ungunya.

Menurut (Munifah 2007), reaksi aktifitas antioksidan dengan DPPH dapat dilihat pada gambar berikut ini :



Gambar 6. Reaksi pengujian aktivitas antioksidan dengan DPPH

2.13 Total Fenol

Senyawa fenol bisa berfungsi sebagai antioksidan karena kemampuannya meniadakan radikal-radikal bebas dan radikal peroksida sehingga efektif dalam menghambat oksidasi lipida (Kinsella et al, 1993).

Fenol adalah senyawa yang mempunyai sebuah cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenol pada bahan makanan dapat dikelompokkan menjadi fenol sederhana dan asam folat (P-kresol, 3-etil fenol, 3,4-dietil fenol, hidroksiquinon, vanilin dan asam galat), turunan asam hidroksi sinamat (p-kumarat, kafeat, asam fenolat dan asam kloregenat) dan flavonoid (katekin, proantosianin, antisianidin, flavon, flavonol dan glikosidanya. Fenol juga dapat menghambat oksidasi lipid dengan menyumbangkan atom hidrogen kepada radikal bebas. Senyawa fenol (AH) jika berdiri sendiri tidak aktif sebagai antioksidan, substitusi grup alkil pada posisi 2, 4 dan 6 dapat meningkatkan densitas elektron gugus hidroksil, sehingga meningkatkan keaktifannya terhadap radikal lipid (Widiyanti, 2006). Ditambahkan oleh Prakash *et al* (2007), bahwa kandungan senyawa fenolik akan mempengaruhi aktivitas penangkapan radikal bebas suatu bahan.

2.14 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda dan mencegah proses oksidasi. Antioksidan juga dinyatakan sebagai senyawa yang secara nyata dapat memperlambat oksidasi, walaupun dengan konsentrasi yang lebih rendah sekalipun dibandingkan dengan substrat yang dioksidasi. Ada empat kemungkinan mekanisme penghambatan yang terjadi yaitu (1) donor hidrogen oleh antioksidan, (2) donor elektron oleh antioksidan, (3) adisi lipida ke dalam cincin aromatis dari antioksidan, dan (4) pembentukan kompleks antara lipida dan cincin aromatis antioksidan (Schultz, 1962).

Menurut Nuraini (2007), senyawa yang terkandung didalam antioksidan

alami antara lain fenol, polifenol, dan yang paling umum adalah flavonoid (flavonol, isoflavon, flavon, katekin, flavonon), turunan asam sinamat, tokofenol, dan asam organik polifungsi. Sedangkan antioksidan sintetik antara lain PG (*propyl galate*), TBHQ (*tert-butylhydroxyquinone*), BHA (*butylated hydroxyanisole*), dan BHT (*butylated hydroxytoluene*).

Mekanisme kerja antioksidan dibagi dalam beberapa jenis diantaranya antioksidan primer, yaitu senyawa yang mengakhiri rantai radikal bebas dalam jenis reaksi oksidasi. Beberapa senyawa antioksidan jika dicampur dapat mempengaruhi kinerjanya dengan efek sinergi. Sinergi yaitu senyawa yang mempunyai sedikit sifat antioksidan tetapi dapat memperbesar efek dari antioksidan primer. Asam askorbat dan asam sitrat memberi efek sinergi terhadap antioksidan yang lain dan sering dipakai sebagai antioksidan dalam pangan (Ketaren, 1986).

Aktivitas antioksidan diukur berdasarkan kemampuannya untuk menangkap radikal DPPH. Keberadaan antioksidan akan menetralisasi radikal DPPH dengan menyumbangkan elektron kepada DPPH yang menghasilkan perubahan warna dari warna ungu menjadi warna kuning. Penghilangan warna akan sebanding dengan jumlah elektron yang diambil oleh DPPH sehingga dapat diukur secara spektrofotometri (Prakash *et al.*, 2007).