

BAB II

LANDASAN TEORI

2.1 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang bekerja menyerang molekul lain untuk mendapat pasangan elektron dan diubah menjadi radikal bebas (Anna, 2007). Radikal bebas akan menempel atau menerima ion hidrogen dari molekul dengan energi disosiasi ikatan rendah seperti asam lemak tak jenuh dan asam fenolik. Kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas meliputi perubahan struktur membran sel, nukleotida pada DNA, dan ikatan sulfhidril kritis pada protein (Sailaja Rao *et al.*, 2011).

Pembentukan radikal bebas dimulai dengan penghilangan hidrogen dari asam lemak (RH) menghasilkan radikal alkil (R^*) dan radikal hidrogen (H^*). Produksi radikal alkil bersifat kompleks secara termodinamika, sehingga inisiasi dimulai dengan katalis seperti dekomposisi hidroperoksida, cahaya, ion logam, atau panas. Radikal alkil (R^*) sangat reaktif dan akan berinteraksi dengan oksigen atmosfer (O_2) untuk membentuk radikal peroksil (ROO^*) yang tidak stabil pada tahap propagasi (Anna, 2007).

Radikal peroksil (ROO^*) sangat tidak stabil dan dapat menarik atom hidrogen dari asam lemak lain (RH) untuk menghasilkan hidroperoksida ($ROOH$) dan radikal alkil baru (R^*). Propagasi berlanjut sampai terminasi dimulai (Anna, 2007). Ketika konsentrasi radikal meningkat, radikal bebas alkil mulai bereaksi dengan dirinya sendiri dan radikal bebas peroksil lainnya membentuk senyawa

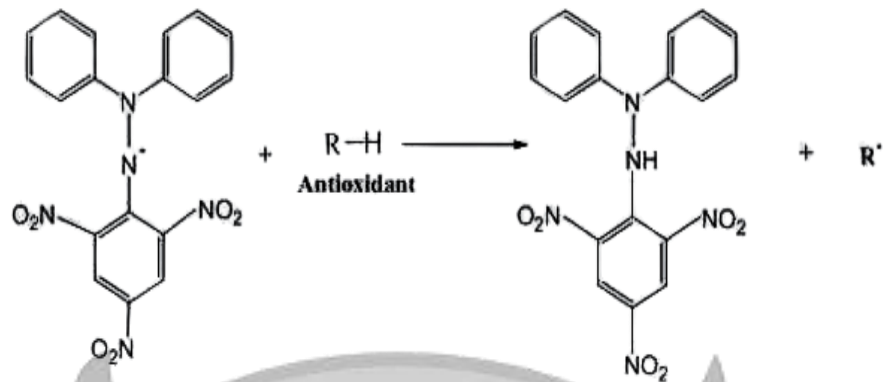
non radikal termasuk hidroperoksida. Hidroperoksida akan dipecah menjadi alkohol, asam keton, dan substrat lain yang lebih stabil (Christen & Smith, 2000).

2.2 Antioksidan

Antioksidan dapat melawan spesies oksigen reaktif untuk menghentikan reaksi berantai radikal atau menghambat produksi radikal. Mekanisme antioksidan dalam siklus autoksidasi bergantung pada molekul. Antioksidan pemecah rantai telah diklasifikasikan melalui dua jalur yaitu transfer atom hidrogen dan transfer elektron tunggal. Pada transfer atom hidrogen, akseptor radikal bebas bereaksi dengan radikal peroksil dalam tahap propagasi (Huang *et al.*, 2005). Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan metode berikut:

1. Metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

Uji 2,2-difenil-1-pikrahidrazil (DPPH) adalah metode sederhana yang dikembangkan untuk analisis kapasitas antioksidan (Huang *et al.*, 2005). Metode DPPH digunakan untuk menentukan kapasitas sampel yang menyumbangkan hidrogen atau elektron untuk memadamkan radikal DPPH. Memadamkan dan mencegah penyebaran radikal melalui transfer atom hidrogen ditiru dalam uji DPPH. Ketika radikal bebas tereduksi, warna larutan DPPH berubah dari ungu menjadi kuning muda dan serapan DPPH akan menurun (Brand-Williams *et al.*, 1995). Mekanisme kerja dari metode ini dapat dilihat pada gambar berikut ini (Shalaby & Shanab, 2013).

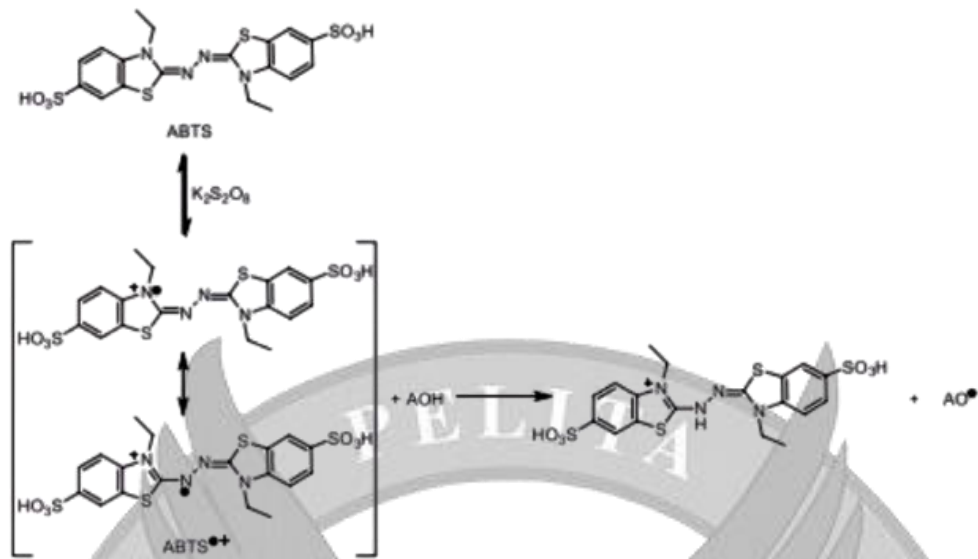


Gambar 2.1 Reaksi Metode DPPH
Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

Kelebihan metode DPPH yaitu dapat digunakan pada sampel berupa padatan atau cairan, praktis, dan larut dalam pelarut organik (Shalaby & Shanab, 2013). DPPH menggunakan pelarut organik diukur pada panjang gelombang 515-520 nm dengan alat spektrofotometri UV-Vis (Suhaling, 2012).

2. Metode 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)

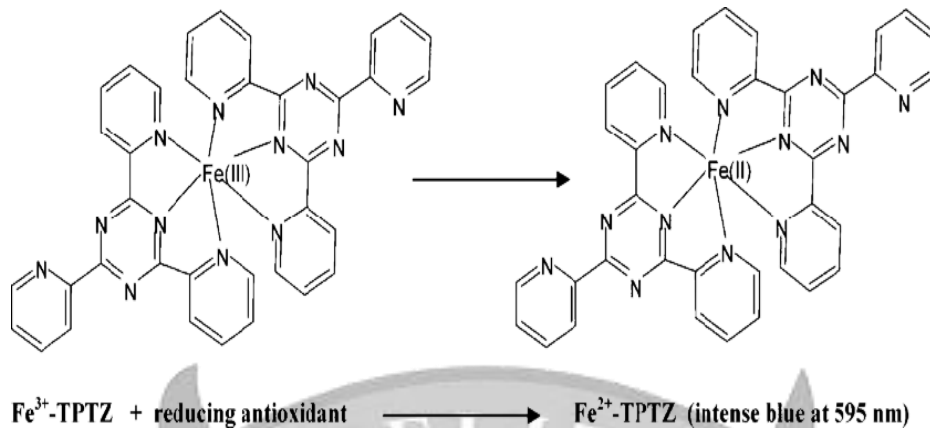
Metode ABTS merupakan metode uji aktivitas antioksidan dengan modifikasi radikal menjadi kation radikal yang direaksikan dengan kalium persulfat. Kation radikal ABTS memiliki nilai absorpsi pada panjang gelombang 700-750 nm (Mutiananda, 2023). Larutan ABTS akan mereduksi senyawa antioksidan yang ditandai dengan perubahan warna awal hijau-biru menjadi tidak berwarna (Shalaby & Shanab, 2013). Kelebihan metode ABTS yaitu dapat bereaksi dengan antioksidan secara cepat (Sukweenadhi *et al.*, 2020).



Gambar 2.2 Reaksi Metode ABTS
 Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

3. Metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)

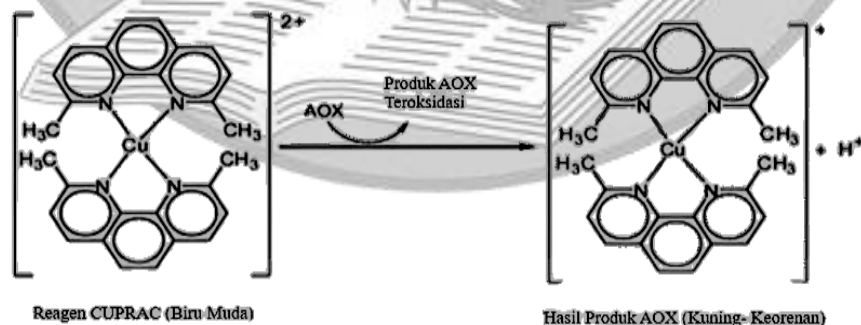
Metode FRAP merupakan metode yang didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe(III)-TPTZ menjadi ion Fe(II)-TPTZ. Senyawa Fe(III)-TPTZ, yang merupakan oksidator dalam tubuh dan menyebabkan kerusakan dalam sel, akan menerima elektron yang ditransfer oleh antioksidan. Metode ini biasanya menggunakan asam askorbat sebagai larutan. Kelebihan metode FRAP adalah murah, cepat, dan reagen dapat diperoleh dengan mudah. Metode ini juga tidak membutuhkan alat canggih untuk menguji kandungan antioksidan total (Haryoto & Frista, 2019).



Gambar 2.3 Reaksi Metode FRAP
Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

4. Metode *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC)*

Metode CUPRAC menguji antioksidan dengan mereaksikan CuSO_4 dan neocuproine. Cu (II) akan diubah menjadi Cu (I) melalui proses donor elektron antioksidan. Metode ini terbilang selektif karena memiliki nilai potensial reduksi yang rendah dan reaksi oksidasi dengan antioksidan cukup cepat (Maryam *et al.*, 2016). Kekurangan dari metode ini adalah menggunakan alat yang canggih dan mahal (Haryoto & Frista, 2019).



Gambar 2.4 Reaksi Metode CUPRAC
Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

Dari keempat metode pengujian antioksidan, DPPH dan ABTS merupakan metode yang paling banyak digunakan. Selain banyak digunakan, metode tersebut merupakan metode yang sederhana karena hanya sedikit senyawa radikal yang digunakan. Sedangkan, FRAP dan CUPRAC merupakan metode yang bersifat kurang stabil karena senyawa radikal bebasnya harus dibuat baru dan harus segera digunakan.

Kekuatan penghambatan dihitung menggunakan parameter *Inhibition Concentration* (IC₅₀), yaitu konsentrasi senyawa antioksidan yang memberi hambatan sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar kekuatan antioksidan yang dapat dilihat pada tabel berikut ini.

Tabel 2.1 Kekuatan Antioksidan

Nilai IC ₅₀ (ppm)	Kekuatan antioksidan
<50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah

(Awe *et al.*, 2013)

2.3 Tumbuhan Mangrove

Mangrove merupakan tanaman yang kaya akan senyawa bioaktif dan dapat digunakan sebagai antioksidan (Winarti *et al.*, 2019). Mangrove berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif yang tinggi seperti polifenol, flavonoid, antosianin, vitamin, antibiotik, dan antioksidan (Thuoc *et al.*, 2018).

Beberapa spesies Mangrove menunjukkan aktivitas antioksidan seperti *Rhizophora mucronata*, *Acanthus ilicifoliu*, *Avicennia marina*, *Bruguiera*

silindris, Sonneratia alba, Nypa fructicaris, Ceriops decandra, Aegiceras corniculatum L, Sonneratia caseolaris L, Kandelia candel, Rhizophora stylosa, Scaevola taccada, Acrostichum aureum, Hirietera fomes, Xylocarpus moluccensis. Khasiat tanaman Mangrove sebagai obat telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat, untuk mengobati penyakit diabetes, hipertensi, luka, gangguan pencernaan, dan kanker (Lubis *et al.*, 2017).

2.4 *Rhizophora stylosa*

2.4.1 Deskripsi Tumbuhan

Rhizophora sp. merupakan salah satu jenis tumbuhan Mangrove, termasuk kelompok tumbuhan tropis yang bersifat toleran terhadap garam (*halophytic*) (Irwanto, 2006). *Rhizophora sp.* termasuk dalam keluarga *Rhizophoraceae* yang dibagi menjadi tiga jenis yaitu *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, dan *Rhizophora stylosa* (Djamaluddin, 2018).



Gambar 2.5 Daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.)

Tumbuhan *R. stylosa* memiliki morfologi yaitu pohon dengan tinggi hingga 15 meter dan permukaan batang berwarna abu-abu kehitaman dengan celah halus. Daunnya berbentuk lonjong dengan panjang 8–12 cm, daun bagian tengah yang lebar, dengan permukaan bawah tulang yang kehijauan dan terdapat bercak hitam tidak merata. Buah *R. stylosa* meruncing di ujungnya dan berukuran 20–60 cm. Ada akar tunjang di dalamnya. *R. stylosa* tinggal di tanah basah yang sedikit berlumpur dan berpasir (Backer *et al.*, 1966).

2.4.2 Klasifikasi Tumbuhan

Tumbuhan *Rhizophora stylosa* Griff. secara taksonomi mempunyai klasifikasi sebagai berikut (Ellison *et al.*, 2008).

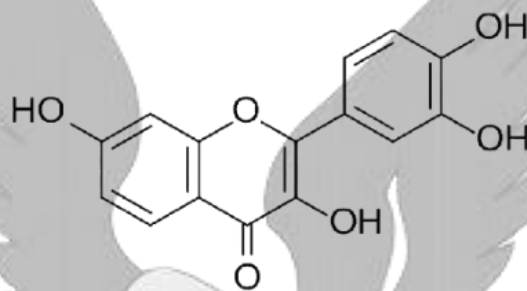
Kingdom : Plantae
Divisio : Magnoliophyta
Classis : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Familia : Rhizophoraceae
Genus : *Rhizophora*
Spesies : *Rhizophora stylosa* Griff.

2.4.3 Kandungan dan Manfaat *Rhizophora stylosa*

Rhizophora sp. termasuk jenis Mangrove yang paling banyak diteliti mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Rohaeti *et al.*, 2010). Salah satunya *Rhizophora stylosa* Griff. yang diketahui

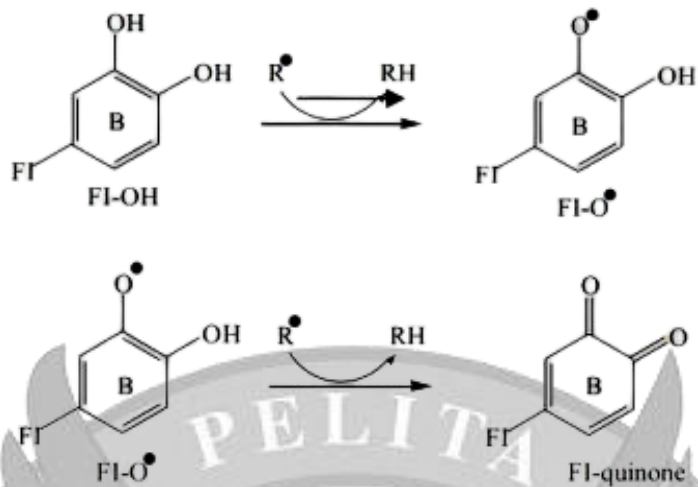
mengandung senyawa metabolit seperti flavonoid, steroid, triterpenoid, dan tanin. Senyawa aktif yang berpotensi sebagai antioksidan adalah flavonoid dan tanin (Willian et al., 2020).

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mempunyai sifat antioksidan (Sadhu *et al.*, 2006). Gugus hidroksil yang mengikat cincin aromatik (OH fenolik) pada flavonoid, akan mudah teroksidasi jika bereaksi dengan oksidator seperti radikal bebas. Struktur flavonoid dapat dilihat pada gambar berikut.



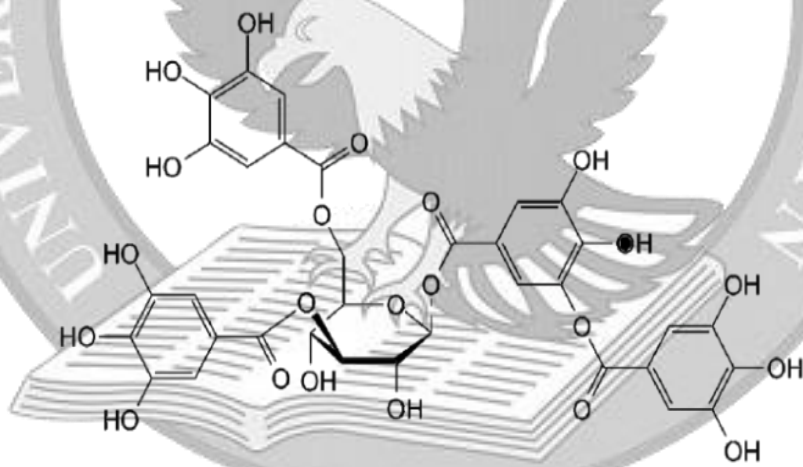
Gambar 2.6 Struktur Flavonoid
Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

Daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) adalah salah satu dari banyak bagian tanaman yang mengandung flavonoid. Tubuh memerlukan senyawa flavonoid sebagai antioksidan untuk melawan radikal bebas dengan menghentikan oksidasi lemak. Flavonoid tertentu menangkap superoksida, sedangkan yang lainnya menangkap turunan radikal oksigen (Haryoto & Frista, 2019). **Gambar 2.7** menunjukkan proses pemecahan ROS (*Reactive Oxygen Spesies*) yang terjadi antara gugus hidroksi pada cincin aromatik yang memberi atom hidrogen dan elektron ke gugus radikal hidroksil, sehingga peroksil dan peroksininitrat menjadi tidak berbahaya.



Gambar 2.7 Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid
 Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

Tanin merupakan senyawa fenolik kompleks yang paling banyak ditemukan di tanaman. Tanin berperan sebagai antioksidan biologis. Tanin berkhasiat lain sebagai anti diare, antibakteri, dan astringen (Pratama *et al.*, 2019).



Gambar 2.8 Struktur Tanin
 Sumber: (Kurniawan *et al.*, 2020)

Gugus fenol dikenal sebagai penghambat radikal yang dapat mengikat radikal bebas dengan memberikan atom hidrogennya melalui transfer elektron, menghasilkan radikal fenoksil (Janeiro & Oliveira Brett, 2004).

2.4.4 Khasiat Etnofarmakologi *Rhizophora stylosa*

R. stylosa dimanfaatkan secara tradisional sebagai sumber bahan pewarna dan obat-obatan, khususnya bagian kulit batangnya (Willian *et al.*, 2020). *R. stylosa* telah cukup lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk penyembuhan luka, rematik, nyeri otot, nyeri punggung, nyeri tulang, kandidiasis mulut, hematuria, dan gangguan liver (Kalasuba *et al.*, 2023).

2.4.5 Khasiat Farmakologi *Rhizophora stylosa*

R. stylosa secara farmakologis belum banyak diteliti. Namun, beberapa penelitian menyimpulkan bahwa *R. stylosa* berpotensi sebagai antioksidan dan penghambat asetilkolinerasa (Wahyuni *et al.*, 2015). *R. stylosa* juga telah diteliti menunjukkan beberapa aktivitas farmakologis seperti antidiabetes, antikanker, antioksidan, sitotoksik, dan antibakteri (Kalasuba *et al.*, 2023).

2.5 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah proses menganalisis, memeriksa, dan mengidentifikasi ada tidaknya senyawa bioaktif pada simplisia dan ekstrak kering *Rhizophora stylosa* Griff. Identifikasi senyawa bioaktif terdiri dari alkaloid, flavonoid, triterpenoid/steroid, tanin, dan saponin dengan prosedur yang telah dilakukan oleh Harborne (Harborne *et al.*, 1987).

1. Alkaloid

Alkaloid adalah golongan senyawa organik yang mengandung setidaknya satu atom nitrogen. Alkaloid adalah molekul kecil yang sering ditemukan pada

tumbuhan. Alkaloid umumnya beracun bagi manusia, tetapi memiliki efek fisiologis yang cukup baik sehingga dimanfaatkan untuk pengobatan (Harborne *et al.*, 1987).

2. Flavonoid

Flavonoid termasuk senyawa polifenol alami yang banyak ditemukan di alam. Flavonoid memiliki gugus hidroksil yang mengikat cincin aromatik (OH fenolik). Flavonoid berperan penting dalam tubuh salah satunya sebagai antioksidan (Endarini, 2016).

3. Steroid dan Triterpenoid

Steroid terdiri dari empat cincin kerangka dasar karbon yang menyatu. Steroid memiliki struktur senyawa yang beragam. Perbedaan ini disebabkan oleh oksidasi cincin karbon dan gugus fungsi teroksidasi yang terikat pada cincin. (Samejo *et al.*, 2013).

Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder yang berasal dari terpenoid. Triterpenoid memiliki kandungan kimia dan farmakologi yang kaya, salah satunya adalah kolesterol (Balafif *et al.*, 2013).

4. Tanin

Tanin adalah turunan fenol yang larut dalam air dan merupakan salah satu zat organik yang sangat kompleks, tanin juga tersebar luas dalam tumbuhan yang merupakan suatu senyawa polifenol (Endarini, 2016).

5. Fenol

Fenol adalah senyawa dengan gugus hidroksil, paling banyak ditemukan di tanaman, dan diketahui memiliki aktivitas antioksidan (Diniyah & Lee, 2020).

6. Saponin

Saponin merupakan glikosida aktif yang mudah diidentifikasi karena memiliki kemampuan dalam membentuk busa stabil (Harborne *et al.*, 1987).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu zat dari padatan atau cairan dengan menggunakan suatu pelarut, dimana pelarut tersebut akan mengekstraksi zat yang dibutuhkan secara kontinu. Pemilihan metode dan efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh sampel yang digunakan, suhu, jenis pelarut, pH, kuantitas, dan waktu (Dulanlebit & Hernani, 2023). Ekstrak terdiri dari beberapa jenis yaitu ekstrak kering, ekstrak kental, dan ekstrak cair. Ekstrak kering mengandung kurang dari 5% kadar air. Ekstrak kental memiliki antara 5-30% kadar air. Ekstrak cair memiliki lebih dari 30% kadar air (Voigt, 1994).

Ekstraksi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu cara dingin dan cara panas. Cara dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi, sedangkan cara panas terdiri dari refluks, soxhlet, digesti, infus, dan dekokta (Depkes RI, 2000). Pemilihan metode ekstraksi dilakukan dengan mempertimbangkan beberapa faktor yaitu stabilitas sampel terhadap suhu. Bahan tanaman yang tahan pemanasan dilakukan ekstraksi cara panas seperti soxhlet atau refluks, sedangkan bahan tanaman yang tidak stabil pada suhu panas diekstraksi dengan cara dingin seperti maserasi (Dewatisari, 2020).

2.7 Maserasi

Maserasi dan remaserasi adalah metode ekstraksi yang sering digunakan, karena sederhana, tidak membutuhkan alat canggih, dan menarik senyawa kimia tanpa pemanasan. Maserasi adalah metode konvensional yang dilakukan dengan merendam serbuk simplisia menggunakan sejumlah pelarut dan tanpa melewati proses pemanasan atau yang disebut dengan ekstraksi cara dingin. Prinsip maserasi adalah cairan penyari melewati dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut, dan larutan yang terperkat didesak ke luar karena ada perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam dan di luar sel. Peristiwa ini berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Dewatisari, 2020).

2.8 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi. (Katja & Suryanto, 2009). Pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi tanaman disesuaikan dengan jenis tanaman, bagian tanaman yang akan diekstraksi, sifat senyawa kimia, dan ketersediaan pelarut. Secara umum, pelarut dibagi menjadi tiga yaitu polar, semi polar, dan non polar. Pemilihan pelarut dilakukan dengan prinsip *like dissolve like* yaitu senyawa harus terlarut dalam pelarut dengan sifat yang sama. Efektivitas ekstraksi senyawa oleh pelarut sangat bergantung pada seberapa larut senyawa tersebut dalam pelarut dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun (Kurniawan *et al.*, 2020).

Etanol merupakan pelarut polar yang umum digunakan dalam ekstraksi. Etanol merupakan pelarut organik yang dianggap lebih aman dibandingkan pelarut organik lainnya, dapat mengekstrak senyawa metabolit sekunder bersifat polar, dan proses pemekatan ekstrak menggunakan suhu rendah (Das *et al.*, 2010).

Air juga merupakan salah satu pelarut polar dengan kepolaran tinggi. Air memiliki ikatan hidrogen terbanyak yang mempengaruhi kelarutannya. Namun, air dapat menyebabkan pembengkakan sel ekstrak yang kemudian memicu reaksi fermentatif (kerusakan bahan aktif lebih cepat). Hal ini dapat menyebabkan hidrolisis dan diperlukan suhu tinggi untuk memekatkan ekstrak (Kawaroe *et al.*, 2019).

2.9 Vitamin C

Vitamin C dikenal dengan asam askorbat yang merupakan antioksidan sekunder yang paling larut dalam air. Asam askorbat bekerja menangkap radikal bebas dengan cara mencegah terjadinya reaksi berantai. Gugus hidroksi bebas yang dimiliki asam askorbat bertindak sebagai penangkap radikal bebas (Isnindar *et al.*, 2011).

2.10 Hipotesis Penelitian

Hipotesis Null (H₀):

1. Ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) memiliki aktivitas antioksidan.

2. Nilai perbandingan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan ABTS tidak berbeda signifikan.

Hipotesis Alternatif (Ha):

1. Ekstrak etanol 96% daun Mangrove (*Rhizophora stylosa* Griff.) tidak memiliki aktivitas antioksidan.
2. Nilai perbandingan aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan ABTS berbeda signifikan.

