

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kanker merupakan salah satu masalah kesehatan utama di dunia dengan jumlah kasus dan kematian tiap tahunnya semakin bertambah. Berdasarkan laporan dari *World Health Organization* (WHO) dan *International Agency for Research on Cancer* (IARC), pada tahun 2022 terdapat hampir 20 juta kasus kanker baru secara global dan hampir 9,7 juta kematian yang disebabkan oleh penyakit ini, serta diperkirakan jumlah kasus akan meningkat menjadi lebih dari 35 juta pada tahun 2050 apabila tidak adanya langkah-langkah pencegahan yang efektif. Hal ini menunjukkan bahwa kanker tetap menjadi tantangan serius yang menuntut pendekatan ilmiah dalam memahami faktor penyebab dan pencegahannya¹.

Stres oksidatif merupakan salah satu mekanisme penting dalam inisiasi dan progresi kanker yang terjadi akibat akumulasi *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Reactive Nitrogen Species* (RNS) yang dihasilkan selama metabolisme seluler. Dalam jumlah fisiologis, molekul reaktif ini berperan dalam homeostasis redoks dan proses pensinyalan sel, namun produksi berlebih dapat mengganggu keseimbangan sistem antioksidan sehingga memicu stres oksidatif². Kondisi ini menyebabkan kerusakan biomolekul seperti lipid, protein, serta DNA melalui mekanisme peroksidasi dan oksidasi biomolekul yang mengakibatkan terjadinya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, kardiovaskular, metabolik, dan neurodegeneratif³. Selain itu, peningkatan produksi radikal bebas oleh obat kemoterapi juga terkait dengan apoptosis pada sel kanker yang menunjukkan sifat ganda radikal bebas⁴. Oleh karena itu, pengendalian stres oksidatif melalui pemanfaatan senyawa antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas menjadi strategi penting dalam pencegahan kerusakan molekuler dan karsinogenesis.

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan ROS sehingga berperan dalam melindungi sel dari kerusakan oksidatif. Meskipun antioksidan sintetik seperti (*Butylated hydroxyanisole*) BHA dan (*Butylated hydroxytoluene*) BHT telah banyak digunakan, beberapa studi menunjukkan adanya kemungkinan efek beracun jika digunakan dalam jangka panjang, sehingga pencarian antioksidan alami menjadi fokus utama dalam penelitian biofarmasi saat ini. Senyawa fenolik dan flavonoid adalah metabolit sekunder yang dikenal memiliki aktivitas antioksidan tinggi karena kemampuannya dalam mendonorkan elektron atau hidrogen untuk menetralkan radikal bebas. Senyawa ini juga sering berkorelasi dengan aktivitas antioksidan total suatu sampel alami⁵.

Jamur laut yang bersimbiosis dengan spons laut merupakan sumber potensial metabolit sekunder bioaktif, termasuk yang memiliki aktivitas antioksidan salah satunya dari spons laut *Aaptos suberitoides*. Spons laut *A. suberitoides* mengandung senyawa aaptamin yang memiliki senyawa bioaktif sitotoksitas, antikanker, dan antiinflamasi⁶. Namun, ketersediaan bahan baku yang terbatas dapat mengganggu ekosistem laut apabila dieksploitasi secara berlebihan. Oleh karena itu, digunakan mikroorganisme simbiosis spons laut sebagai alternatif

yang secara mutualisme dapat memproduksi senyawa yang membantu inangnya melawan organisme patogen. Salah satunya, jamur *Aspergillus unguis* yang dapat diisolasi dari tanah, lumut kerak, dan organisme laut seperti ubur-ubur, ganggang laut, spons, dan lainnya. *A. unguis* telah dilaporkan mengandung senyawa metabolit sekunder seperti depsidone dan poliketida aromatik yang berpotensi memiliki aktivitas biologis yang penting salah satunya sebagai antioksidan^{7,8}. Pada penelitian sebelumnya, telah dilaporkan ekstrak etanol jamur *A. unguis* memiliki kemampuan penangkalan radikal bebas dengan nilai IC₅₀ DPPH sebesar 42,84 mg/L yang tergolong antioksidan sangat kuat⁹. Selain itu, kandungan senyawa antioksidan dari ekstrak etil asetat *A. unguis* menunjukkan antioksidan yang kuat dengan nilai IC₅₀ DPPH sebesar 73,91 mg/L¹⁰. Selain itu laporan lain menunjukkan ekspresi aktivitas antioksidan dari isolat *A. unguis* yang tumbuh pada media berbeda yang menegaskan bahwa kondisi kultur dan media dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder termasuk senyawa antioksidan¹¹. Temuan ini menunjukkan bahwa *A. unguis* merupakan sumber metabolit sekunder yang potensial sebagai penghasil antioksidan alami.

Meskipun telah ada laporan beberapa penelitian sebelumnya mengenai aktivitas antioksidan dari ekstrak *A. unguis*, namun penelitian mengenai perbandingan profil fitokimia, kandungan total fenolik dan flavonoid, serta aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi ekstrak etanol dengan kepolaran yang berbeda-beda masih terbatas. Selain itu, hubungan antara kandungan senyawa fenolik/flavonoid dengan kemampuan antioksidan tiap fraksi belum diuraikan secara sistematis. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan profil fitokimia, kandungan total flavonoid dan fenolik, serta aktivitas antioksidan fraksi-fraksi ekstrak etanol simbiosis spons laut *A. unguis* sebagai dasar ilmiah dalam mengevaluasi potensi antioksidan alami dan relevansinya terhadap mekanisme stres oksidatif yang berkontribusi pada kerusakan DNA.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apa kelompok senyawa metabolit sekunder dari fraksi-fraksi ekstrak etanol jamur *A. unguis* simbiosis spons laut *A. suberitoides*?
2. Berapa kandungan total flavonoid (TFC) dan fenolik (TPC) dari fraksi-fraksi ekstrak etanol jamur *A. unguis* simbiosis spons laut *A. suberitoides*?
3. Bagaimana aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi ekstrak etanol jamur *A. unguis* dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Menentukan kelompok senyawa metabolit sekunder dari fraksi-fraksi (heksana, etil asetat dan butanol) ekstrak etanol jamur *A. unguis* simbiosis spons laut *A. suberitoides*.

2. Menghitung kandungan total flavonoid (TFC) dan fenolik (TPC) dari fraksi-fraksi (heksana, etil asetat dan butanol) ekstrak etanol jamur *A. unguis* simbion spons laut *A. suberitoides*.
3. Menentukan aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi (heksana, etil asetat dan butanol) ekstrak etanol jamur *A. unguis* dengan metode DPPH, ABTS, dan FRAP.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kelompok senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam jamur *A. unguis* simbion spons laut *A. suberitoides*, total kandungan flavonoid dan fenolik, serta aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH dan ABTS, serta kemampuan reduksi besi dengan FRAP dari fraksi-fraksi ekstrak etanol dari jamur *A. unguis*. Selain itu, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam pengembangan *drug discovery*.



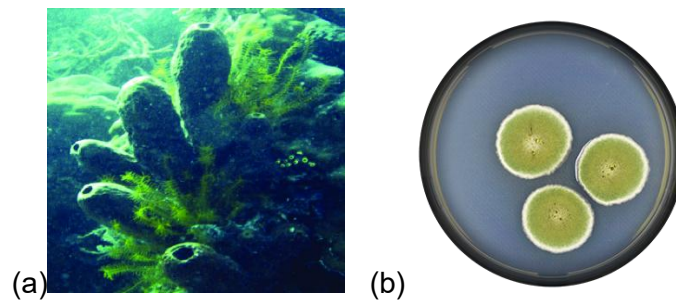
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Taksonomi dan Karakteristik Jamur *Aspergillus unguis*

Habitat laut telah diakui sebagai sumber yang melimpah dari senyawa kimia baru dengan berbagai aktivitas farmakologis yang bermanfaat. Selama dekade terakhir, lebih dari 1.000 senyawa alami laut baru dilaporkan setiap tahun. Sementara penemuan terhadap senyawa baru dari tunicata, cnidaria, dan spons menurun, namun terdapat peningkatan yang signifikan dalam jumlah senyawa baru yang diisolasi dari bakteri dan jamur laut. Pada tahun 2019 telah dilaporkan bahwa sekitar 47% ditemukan senyawa baru yang dihasilkan dari jamur laut yang menyumbang hampir setengah dari total senyawa alami⁸. Adapun jenis genus jamur yang berasal dari laut, yakni *Aspergillus* dan *Penicillium* merupakan genus yang menghasilkan banyak senyawa alami baru yang menunjukkan aktivitas antimikroba atau sitotoksik. Salah satunya yakni berasal dari spons laut *Aaptos suberitoides*. Spons laut ini merupakan spesies dari famili Subiritidae yang banyak ditemukan melimpah di Samudera Pasifik, terutama di Indonesia, Singapura, dan Vietnam. Genus *Aaptos* mengandung senyawa alkaloid, lipopeptida, dan senyawa fenolik. Senyawa-senyawa yang diperoleh dari *Aaptos* memiliki berbagai aktivitas biologi termasuk sitotoksik, antibakteri, dan antijamur¹². Seperti spons pada umumnya, spesies ini memiliki tubuh yang berpori dan permukaan yang keras seperti batu. Selain itu, *Aaptos suberitoides* juga dapat menyerap oksigen dari air melalui proses difusi. Salah satu simbiosis spons laut *A. suberitoides* adalah jamur *A. unguis* yang dikenal sebagai produsen berbagai senyawa poliketida fenolik yang menunjukkan berbagai aktivitas farmakologis seperti antibakteri, antifungal, sitotoksik, dan antioksidan¹³.

Jamur *A. unguis* termasuk ke dalam bagian *Aspergillus Nidulantes*, sebuah kelompok jamur tanah yang mirip dengan *Ascospores* dan *Kleistotisia* dari *Emericella nidulans*. Namun, *A. unguis* memiliki ciri khas berupa hifa berduri. Beberapa sinonim telah digabungkan ke dalam spesies ini, termasuk *Sterigmatocystis unguis*, *Aspergillus laokiashanensis*, dan *Aspergillus mellinus*. Berikut klasifikasi dari jamur *A. unguis*:

Kingdom : Fungi
Divisi : Ascomycota
Kelas : Eurotiomycetes
Orde : Eurotiales
Famili : Trichocomaceae
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *Aspergillus unguis*



Gambar 2.1 Spons laut *Aptos suberitoides* (a) dan jamur *Aspergillus unguis* (b)¹⁴

A. unguis terdapat di tanah beriklim tropis dan subtropis tetapi juga telah diisolasi dari berbagai habitat laut dan perairan, seperti ubur-ubur, ganggang laut, spons, dan lainnya. Jamur ini tersebar luas yang memiliki potensi besar untuk “one strain many compounds” (OSMAC) karena dapat tumbuh dalam media kultur dengan sumber karbon dan nitrogen yang berbeda, seperti kentang dextrose, oatmeal, gliserol kasein, ekstrak ragi sukrosa, Czapek-Dox, dan ekstrak malt. Selain itu, juga digunakan media agar padat sebagai media utama pertumbuhan jamur. Pada berbagai kondisi, media dapat ditambahkan dengan garam spesifik untuk mempelajari asimilasi dan modulasi produksi metabolit sekunder atau dengan air laut untuk meniru lingkungan isolat laut. Penggunaan biologi *A. unguis* dan metode pertumbuhan yang berbeda merupakan alternatif yang sangat baik untuk penemuan metabolit baru dari jamur ini^{15,7}.

Jamur *A. unguis* telah diidentifikasi memiliki senyawa metabolit sekunder yang diklasifikasikan menjadi depsides, depsidones, phthalides, cyclopeptides, indanones, diarylethers, pyranose, turunan asam benzoate, turunan orcinol/orcinillate dan sesterpenoid. Depsides merupakan senyawa yang dihasilkan melalui biosintesis dari penggabungan dua unit turunan asam orsellinik atau penggabungan satu unit turunan asam orsellinik dengan satu unit turunan orcinol. Selain itu, depsides terkait dengan depsidones dan umumnya diakui sebagai prekursor biosintetik. Adapun senyawa baru yang telah berhasil diidentifikasi dari depsides seperti aspergiside A, aspergiside B, dan aspergiside C. Depsidones ditemukan memiliki berbagai aktivitas biologis seperti aktivitas herbisida yang kuat, sebagai penghambat integrasi HIV, antibakteri terhadap bakteri resisten terhadap banyak obat, dan aktivitas yang mendukung pertumbuhan hewan. Selain itu, depsidones juga dapat dijadikan sebagai inhibitor yang menargetkan eksositosis faktor yang mematikan antraks, sebagai inhibitor enzim Rab geranyleranyl transferase, terapi potensial untuk pengobatan kanker dan osteoporosis, serta dapat digunakan untuk pengembangan obat. Kemampuan senyawa depsidones lainnya yakni dapat menghambat enzim aromatase serta target terapeutik penting untuk pengobatan kanker payudara⁷⁻¹⁶.

2.2 Senyawa Antioksidan

Senyawa antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang mampu menetralkan suatu radikal bebas sehingga memiliki potensi sebagai penghambat terjadinya penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, karsinogenesis, dan penyakit lainnya. Senyawa ini

diperlukan oleh tubuh dalam mekanisme perlindungan dari serangan radikal bebas yang dapat diperoleh dari berbagai sumber. Selain itu, adanya senyawa antioksidan juga dapat menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Radikal bebas umumnya merupakan *reactive oxygen species* (ROS) dan *reactive nitrogen species* (RNS) yang mampu eksistensi secara mandiri. ROS dan RNS secara umum dapat dikategorikan menjadi dua kelompok radikal dan nonradikal seperti pada **Tabel 2.1**.

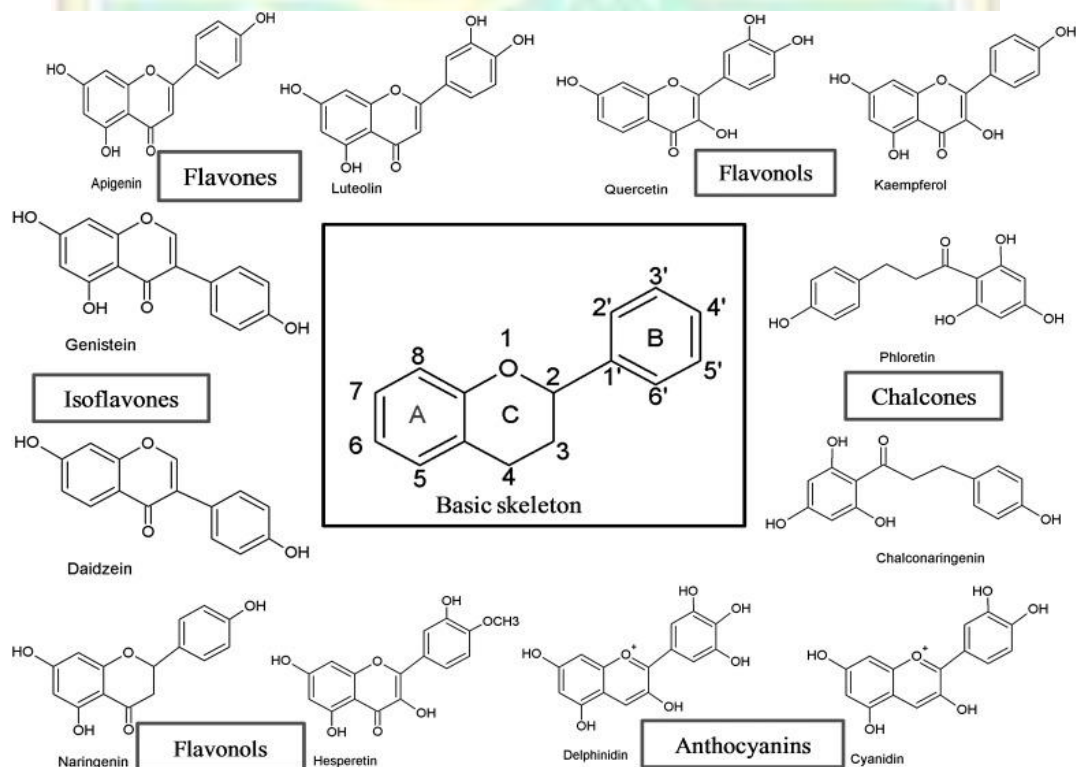
Tabel 2.1 ROS radikal dan RNS nonradikal¹⁷

<i>Reactive Oxygen Species</i> (ROS)		<i>Reactive Nitrogen Species</i> (ROS)	
Radikal hidroksil	HO•	Hidrogen peroksida	H ₂ O ₂
Radikal superoksida	O ₂ •	Singlet oksigen	¹ O ₂
Radikal hidroperoksil	HOO•	Ozon	O ₃
Radikal lipid	L•	Lipid hidroperoksida	LOOH
Radika lipid peroksil	LOO•	Asam hipoklorus	HOCl
Radikal peroksil	ROO•	Peroksinitrit	ONOO ⁻
Radikal lipid alkoksil	LO•	Dinitrogen trioksida	N ₂ O ₃
Radikal nitrogen dioksida	NO ₂ •	Asam nitrous	HNO ₂
Radikal nitrit oksida	NO•	Nitril klorida	NO ₂ Cl
Radikal thiyil	RS•	Nitroksil anion	NO
Radikal protein	P•	Nitrosil kation	NO ⁺

Radikal bebas dapat merusak membran sel serta merusak dan mengubah DNA yang memicu terjadinya resiko terkena kanker serta merusak dan menonaktifkan protein. Radikal bebas dihasilkan dalam tubuh oleh berbagai stem endogen dan eksogen, termasuk kondisi patologis dan paparan terhadap kondisi fisiokimia yang berbeda. Pembentukan radikal bebas dalam tubuh merupakan proses berkelanjutan melalui reaksi enzimatik dan nonenzimatik. Adapun pada reaksi enzimatik radikal bebas terlibat dalam mitokondria, peroksisom, dan organel fagolistik sedangkan pada reaksi nonenzimatik dihasilkan oleh radiasi ionisasi dan reaksi nonenzimatik oksigen dengan senyawa organik. Radikal bebas dapat menyebabkan peningkatan stres oksidatif meskipun tubuh memiliki mekanisme pertahanan antioksidan untuk menyeimbangkan sistem redoks, produksi berlebihan ROS dan RNS mengakibatkan stres oksidatif dan nitrosatif. Stres oksidatif maupun nitrosatif kronis ini dapat mengakibatkan berbagai penyakit salah satunya kanker. Hal ini terbukti bahwa produksi berlebihan radikal bebas memiliki hubungan erat dengan peningkatan insiden kanker⁴. Oleh karena itu, antioksidan dapat membantu menghentikan proses kerusakan sel dengan cara memberikan elektron kepada radikal bebas sehingga tidak mempunyai kemampuan untuk mengambil elektron dari sel dan DNA. Aktivitas suatu senyawa antioksidan tergantung pada beberapa faktor seperti kandungan lipid, konsentrasi antioksidan, suhu, dan tekanan oksigen^{18,19}. Selain itu, senyawa antioksidan juga dapat digunakan untuk detoksifikasi (ROS) yang memiliki asal

usul enzimatik dan nonenzimatik dengan mode aksi intraseluler atau ekstraseluler (misalnya penyerap O_2 tunggal, penangkal radikal, donor elektron, donor hidrogen, dekomposer peroksida, inhibitor enzim, regulasi ekspresi gen, pembantu sinergis, dan agen pengikat logam)²⁰.

Beberapa senyawa kimia memiliki kemampuan antioksidan dalam menangkal radikal bebas misalnya senyawa polifenol. Polifenol merupakan salah satu kelompok antioksidan yang paling banyak terdapat dalam tanaman pangan, dengan lebih dari 8000 struktur fenolik. Selain itu, polifenol bersifat multifungsional di antaranya dapat digunakan sebagai pereduksi atau donor elektron, penangkap radikal bebas, pengkkelat logam, dan peredam terbentuknya oksigen singlet. Turunan polifenol sebagai antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Salah satu senyawa polifenol yang mengandung aktivitas antioksidan adalah flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok senyawa yang memiliki struktur dasar 2-fenilkromen-4-on atau 2-fenil-1-benzopiran-4-on yang terdapat melimpah di alam dengan sebagian besar dalam bentuk sebagai senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan. Flavonoid dapat dibedakan berdasarkan tingkat oksidasi pada cincin γ -piranon, seperti flavon, flavonoid, dan flavanon. Di alam, sebagian besar flavonoid ditemukan sebagai glikosida karena gugus gula meningkatkan kelarutan dari molekul flavonoid hidrofobik di dalam air. Flavonoid alami telah diteliti secara luas dapat mencegah berbagai penyakit seperti kanker atau penyakit kardiovaskular. Selain itu, flavonoid memiliki kemampuan aktivitas antioksidan yang sebagian besar bergantung pada jumlah dan posisi hidroksil pada strukturnya. Berikut adalah struktur flavonoid dan turunannya.



Gambar 2.2 Struktur kimia senyawa flavonoid dan turunannya²¹

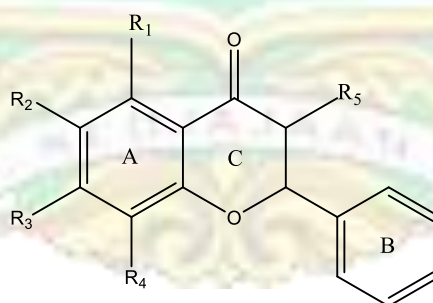
2.3 Uji Fitokimia

Fitokimia adalah senyawa metabolit sekunder yang tidak secara langsung diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan yang memiliki peran penting seperti pertahanan diri tanaman terhadap hama, penyakit, dan stres lingkungan, interaksi ekologis yakni berupa pewarnaan, aroma, atau rasa, serta beberapa senyawa memiliki aktivitas biologis penting bagi manusia misalnya efek antimikroba, antioksidan, antikanker²².

2.3.1 Total Flavonoid Content (TFC)

Total Flavonoid Content (TFC) merupakan parameter kuantitatif yang digunakan untuk memperkirakan jumlah total senyawa flavonoid dalam suatu bahan alam, terutama ekstrak tanaman dan produk turunannya. Penentuan TFC umumnya digunakan sebagai metode skrining awal sebelum dilakukan analisis fitokimia lanjutan menggunakan teknik kromatografi seperti HPLC atau LC-MS. Flavonoid merupakan salah satu golongan utama metabolit sekunder polifenolik yang tersusun atas kerangka karbon C6-C3-C6, dengan variasi gugus hidroksil, metoksi, dan glikosida yang sangat memengaruhi aktivitas biologinya. Senyawa ini banyak dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antikanker, antiinflamasi, dan antimikroba, sehingga pengukuran TFC penting dilakukan dalam studi bioaktivitas bahan alam.

Pengukuran TFC dilakukan dengan metode spektrofotometri berbasis kompleksasi AlCl_3 yang merupakan metode paling banyak digunakan karena prosedurnya sederhana, biaya relatif rendah, waktu analisis singkat, serta mudah diaplikasikan pada berbagai matriks sampel. Adapun prinsip metode AlCl_3 didasarkan pada pembentukan kompleks berwarna antara ion Al(III) dengan gugus karbonil (C4) dan gugus hidroksil (C3 atau C5) pada struktur flavonoid (**Gambar 2.3**). Kompleks ini menghasilkan serapan maksimum pada panjang gelombang 510 menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Selain itu, tidak semua jenis flavonoid memiliki gugus pengkhelat tersebut, nilai TFC hanya menggambarkan flavonoid yang bereaksi dengan AlCl_3 bukan seluruh flavonoid total^{23,24}.



Gambar 2.3 Struktur dasar flavonoid

2.3.2 Total Phenolic Content (TPC)

Total Phenolic Content (TPC) merupakan parameter yang digunakan untuk mengukur jumlah total senyawa fenolik dalam suatu bahan alam. Senyawa fenolik adalah metabolit sekunder yang memiliki struktur aromatik dengan gugus hidroksil dan berkontribusi besar terhadap aktivitas biologis terutama dalam hal aktivitas antioksidan. Pengukuran TPC digunakan sebagai pendekatan awal untuk menilai potensi antioksidan suatu sampel karena kemampuan

senyawa fenolik dalam menyumbangkan elektron sehingga dapat menghambat reaksi oksidatif. Penentuan TPC umumnya menggunakan metode Follin-Ciocalteu yang melibatkan reaksi reduksi kompleks fosfomolibdat-fosfotungstat oleh senyawa fenolik dalam kondisi basa. Reaksi tersebut menghasilkan pembentukan warna biru yang intensitasnya berbanding lurus dengan konsentrasi senyawa fenolik dalam sampel yang selanjutnya diukur pada panjang gelombang 765 nm dengan spektrofotometri UV-Vis. Meskipun metode Follin-Ciocalteu banyak digunakan karena sederhana dan sensitive, metode ini tidak sepenuhnya selektif terhadap senyawa fenolik karena berbagai senyawa pereduksi non-fenolik juga dapat berkontribusi terhadap pembentukan warna. Oleh karena itu, nilai TPC digunakan sebagai indikator awal dalam menilai kontribusi senyawa fenolik terhadap aktivitas antioksidan suatu sampel²⁵.

2.4 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian senyawa metabolit yang mengandung aktivitas antioksidan dilakukan dalam beberapa metode, yaitu sebagai berikut.

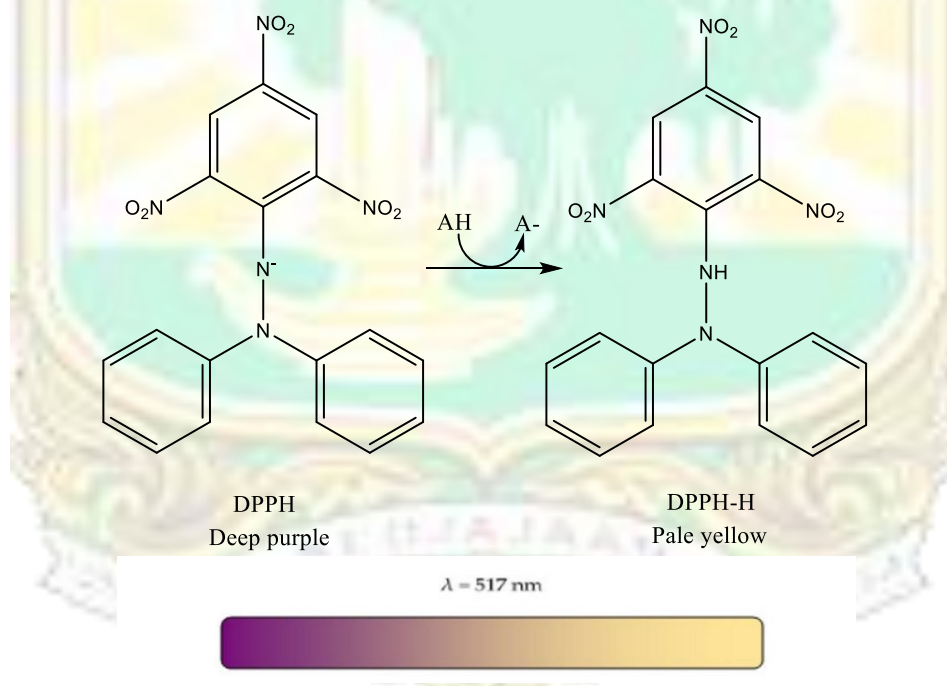
2.4.1 Metode DPPH

Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) adalah metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil dan tidak membentuk dimer akibat adanya delokalisasi elektron bebas pada seluruh molekul. Delokalisasi elektrob bebas ini mengakibatkan terbentuknya warna ungu pada larutan DPPH, sehingga bisa diukur absorbansinya pada panjang gelombang sekitar 517 nm. Uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode ini dapat diamati secara kolorimteri, yaitu berdasarkan dari hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh antioksidan. Ketika larutan DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka warna ungu dari larutan akan hilang seiring dengan tereduksinya DPPH. Hasil persen (%) inhibisi tersebut disubstitusikan dalam persamaan linear di mana hasil dari substitusi persen (%) inhibisi tersebut kemudian diinterpretasikan sebagai nilai IC_{50} dengan beberapa klasifikasi, yaitu nilai <50 mg/mL tergolong sangat kuat, 50-100 mg/mL tergolong kuat, 100-150 mg/mL tergolong sedang, dan 151-200 mg/mL.

Kelebihan dari metode DPPH adalah secara teknis lebih mudah, dapat dikerjakan dengan cepat dan hanya membutuhkan spektrofotometer *Ultraviolet-Visible* (UV-Vis). Sedangkan kelemahan dari metode ini adalah radikal DPPH hanya dapat dilarutkan dalam media organik (terutama media alkoholik), tidak pada media akueous sehingga membatasi kemampuannya dalam penentuan peran antioksidan hidrofilik. Penentuan aktivitas antioksidan berdasarkan perubahan absorbansi DPPH harus diperhatikan karena absorbansi radikal DPPH setelah bereaksi dengan antioksidan dapat berkurang oleh cahaya, oksigen, dan tipe pelarut¹⁸.

Antioksidan bereaksi dengan radikal bebas melalui mekanisme yang berbeda, yaitu transfer atom hidrogen (HAT) atau mekanisme transfer elektron tunggal (SET) maupun

kombinasi mekanisme HAT dan SET menjadi contoh utama. Reaksi HAT adalah gerakan gabungan dari proton dan elektron dalam langkah kinetik tunggal, seperti yang ditunjukkan pada gambar/13. Dalam mekanisme HAT, radikal bebas menghilangkan satu atom hidrogen dari antioksidan, dan kemudian antioksidan akan menjadi radikal. Dalam mekanisme ini, ikatan disosiasi entalpi (BDE) merupakan parameter penting dalam mengevaluasi aksi antioksidan. Semakin rendah BDE dari gugus penyumbang H dalam antioksidan potensial, maka akan semakin mudah untuk terjadinya reaksi inaktivasi radikal bebas. Reaksi SET ditiru oleh transfer elektron tunggal dari nukleofil ke substrat, menghasilkan zat antara radikal yang kemudian terlibat dalam sejumlah peristiwa seperti pada gambar/13. Dalam mekanisme SET, antioksidan menyediakan elektron untuk radikal bebas dan dengan sendirinya menjadi kation radikal. Dalam mekanisme ini, potensial ionisasi (IP) dari antioksidan adalah faktor energi yang paling penting dalam mengevaluasi aktivitas antioksidan. Semakin rendah nilai potensial ionisasi, semakin mudah abstraksi elektron. Dalam beberapa keadaan, reaksi HAT dan SET terjadi secara bersamaan dan mekanisme reaksinya ditentukan oleh struktur dan kelarutan antioksidan, yaitu koefisien partisi dan polaritas pelarut. Adapun contoh pengujian berbasis HAT, yaitu ABTS dan ORAC sedangkan pengujian berbasis SET termasuk DPPH dan FRAP²⁶. Berikut mekanisme reaksi dari metode DPPH²⁷.



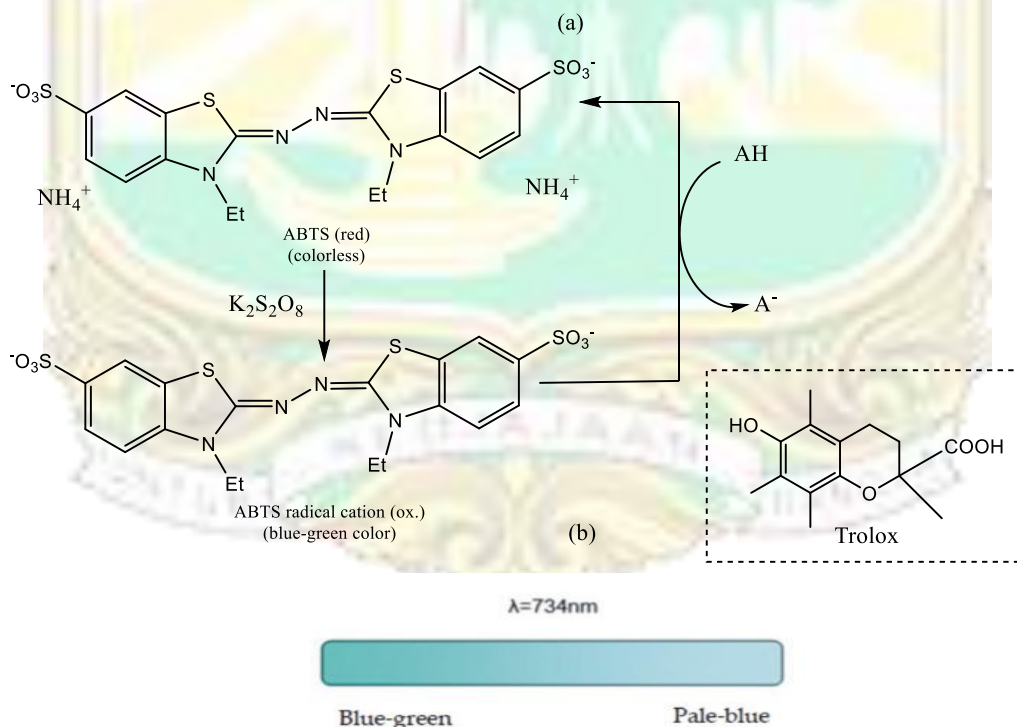
Gambar 2.4 Mekanisme reaksi uji DPPH¹⁷

2.4.2 Metode ABTS

Metode lain dalam pengujian antioksidan dalam menangkal radikal bebas adalah metode ABTS. Metode ABTS (Asam 2,2'-azinobis(3-etilbenzanatiazolin-6-sulfonat) memiliki prinsip penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. ABTS merupakan radikal bebas yang pusat nitrogennya memiliki karakteristik warna biru-hijau dengan nilai absorbansi maksimum pada 414, 734, dan

815 nm dalam media air dan pada 414, 730, dan 873 dalam medium etanolik. ABTS mengalami kehilangan warna apabila tereduksi oleh antioksidan. Metode ABTS sangat sensitif dengan cahaya, bahkan pembentukan ABTS, serta memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam keadaan gelap.

ABTS tidak tersedia secara komersial tetapi harus dihasilkan oleh emisi elektron dari atom nitrogen yang membentuk molekul dari ABTS. Pembentukan kation ini dapat dilakukan dengan oksidasi ABTS melalui bahan kimia, enzimatis, atau reaksi elektrokimia, menjadi pembentukan kimia melalui penggunaan kalium persulfat, mangan dioksida, atau 2,2'-azinobis- (2-amidino-propana) dihidroklorida (AAPH) yang merupakan metode yang paling banyak digunakan. Dengan cara ini, fondasi ABTS didasarkan pada pengukuran kemampuan antioksidan untuk mengurangi yang sebelumnya radikal kationik yang dihasilkan yang mengarah pada pengurangan warna dan pengurangan absorbansi pada sampel. Dengan demikian, pengukuran kapasitas antioksidan dapat dilakukan melalui spektrofotometer UV/Vis dengan panjang gelombang yang umum digunakan adalah 734 nm karena pada panjang gelombang tersebut kemungkinan interferensi dari komponen penyerap lain dan kekeruhan sampel dapat diminimalisir. Dalam hal kuantifikasi, nilai ABTS diperoleh dengan menghubungkan pengurangan absorbansi sampel dengan penggunaan antioksidan standar, biasanya trolox karena pengurangan absorbansi tergantung secara linear pada konsentrasi zat antioksidan²⁸.



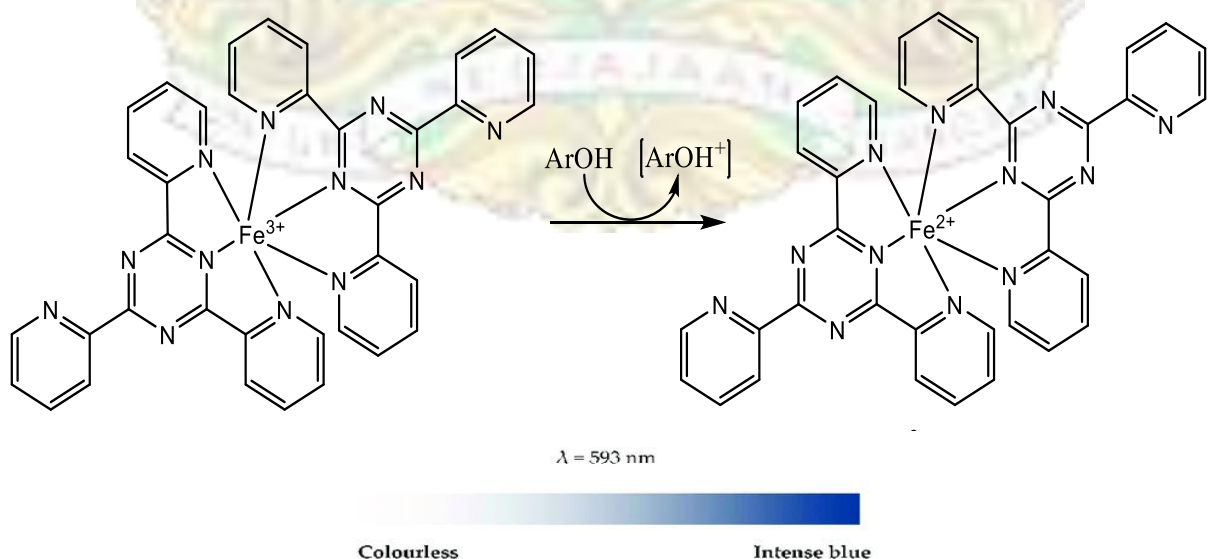
Gambar 2.5 Reaksi yang terlibat dalam metode ABTS¹⁷

Kelebihan dari metode ABTS adalah metode yang sederhana dari sudut pandang operasional yang memungkinkannya menjadi uji yang banyak digunakan untuk menentukan kapasitas antioksidan. Selain itu, memungkinkan penggunaan pH dengan rentang yang lebih luas dan uji tes analisisnya yang cepat. Selain itu, metode ABTS memungkinkan pengukuran

senyawa antioksidan lipofilik dan hidrofilik sejak larut dalam pelarut air dan organik dan tidak terpengaruh oleh kekuatan ion. Namun, kekurangan dari metode ini adalah radikal kationik ABTS tidak ditemukan dalam sistem biologis yang mewakili sumber radikal non fisiologis yang dapat menghasilkan hasil yang tidak memadai mewakili makanan. Selain itu, penentuan kapasitas antioksidan oleh ABTS dapat menyebabkan perkiraan yang terlalu tinggi dan meremehkan kapasitas antioksidan sampel karena termodinamika reaksi dan lambatnya reaksi dengan senyawa antioksidan tertentu²⁸.

2.4.3 Metode FRAP

Metode daya antioksidan pereduksi ion besi atau kemampuan pereduksi besi plasma disingkat dengan FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) yang dikembangkan oleh Iris Benzie dan JJ Strain. Metode FRAP didasarkan pada reduksi ferric-tripyridyltriazine [$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})$]³⁺, membentuk kompleks besi berwarna biru pekat [$\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})$]²⁺ dalam kondisi asam (pH 3,6). Warna yang dikembangkan dalam pengujian ini adalah biru pekat yang merupakan warna komplementer dari oranye dengan absorbansi dibaca pada panjang gelombang 593 nm. Metode ini dikembangkan sedemikian rupa sehingga dapat dilakukan di setiap laboratorium karena kesederhanaan, reproduktivitas yang tinggi, dan instrumentasi yang sederhana. Potensial redoks Fe (III) adalah 0,70 V sebanding dengan potensial redoks ABTS 0,68 V. Menariknya, ada garis tipis antara ABTS dan FRAP kecuali bahwa uji ABTS dilakukan pada pH netral sedangkan FRAP dilakukan di bawah kondisi asam. Namun, pengujian ini tidak spesifik karena jika senyawa yang ada dalam reaksi campuran memiliki potensi redoks lebih rendah dari Fe (III) (<0,70 V), senyawa tersebut yang akan bertanggung jawab untuk reduksi [$\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})$]³⁺, yang mengarah ke perkiraan yang terlalu rendah. Misalnya, buffer asetat ditambahkan pertama kali lalu ditambahkan FeCl_3 dan TPTZ ditambahkan terakhir. Urutan ini sangat penting untuk mencegah reduksi FeCl_3 oleh TPTZ. Aktivitas FRAP dapat dinyatakan sebagai ekuivalen dengan Trolox, asam galat, asam askorbat, kuersetin atau α -tokoferol²⁷. Adapun mekanisme reaksi metode FRAP sebagai berikut.



Gambar 2.6 Mekanisme reaksi metode FRAP²⁷