

## TINJAUAN PUSTAKA

Ordo : Curcubitales  
Famili : *Curcubitaceae*  
Genus : *Lagenaria*  
Spesies : *Lagenaria siceraria* (Molina) Standly

Nama daerah tanaman Wulukula/labu air (Widyanigrum, 2011 :512):  
Sumatera: Labu air, Labu Frangi (Melayu), Tabu (Sumatera Utara), Jawa: Kukuk  
(Sunda) Labu ayer, Waluh kenti (Jawa), Labu Lente (Madura), Nusa Tenggara  
Karobu (Sumba Timur), Sulawesi: Labu putih, Sambiki (Manado), Gorontalo:  
Waluh, Sayur Waluh

### **2.1.3 Morfologi Tumbuhan Wulukula**

Morfologi tanaman Wulukula/labu air (Widyanigrum, 2011 : 511)

Habitus : Herbal, semusim, panjang 2-3 meter  
Batang : memanjat atau menjalar, bersegi, gundul, memiliki alat pembelit,  
hijau  
Daun : Tunggal, bertangkai silinder, tersebar, bulat, terlekuk menjari, tepi  
bergigi pertulangan menjari, pangkal membulat, diameter 10-40  
cm, permukaan kasar, hijau.  
Bunga : Tunggal, berumah satu, diketiak daun, bunga jantang bertangkai  
silinder, pendek, hijau kekuningan, mahkota lima helai, ujung  
berlekatan, panjang 2-5 cm, benang sari 5, panjang 1-1,5 cm, putik  
tiga, bunga betinahijau pucat tertutup bulu  
Buah : Buni, bulat, panjang, hijau kekuningan

Biji : Banyak, kecil, lonjong, putih

Akar : Tunggang, putih

#### **2.1.4 Kandungan Kimia Tumbuhan Wulukula**

Buah Wulukula/labu air (*Lagenaria siceraria* (Molina) Standly) mengandung kalsium, zat besi, saponin dan polifenol, serta vitamin C (Marliana dan Saleh 2011 : 63), vitamin E (Phancal dkk, 2012). Daun dan buah mengandung saponin dan polifenol (Widyanigrum, 2011 : 512).

#### **2.1.5 Khasiat Tumbuhan Wulukula**

Berbagai kajian ilmiah tentang tumbuhan Wulukula telah mengungkapkan bahwa buah wulukula atau labu air berkhasiat sebagai obat. Pemanfaatan buah Wulukula sebagai obat antara lain untuk pengobatan demam yang tinggi akibat sakit tipus atau infeksi, pencahar iritasi kulit, serta mengobati perut kembung (Widyanigrum, 2011:512). Masrifah dkk, (2017) mengemukakan bahwa daun dan kulit labu air memiliki daya antioksidan. Chooi, (2008) melaporkan bahwa buah labu air mengobati nyeri dada, jerawat, demam. Biji labu air juga berkhasiat sebagai pencahar, dan mengobati batuk.

### **2.2 Senyawa Metabolit Sekunder**

Senyawa metabolit sekunder adalah senyawa organik hasil metabolisme tubuh makhluk hidup yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme. Senyawa

metabolit sekunder dalam tubuh makhluk hidup ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antar spesies satu dan yang lainnya.

Proses metabolisme yang terjadi dalam tubuh makhluk hidup, senyawa metabolit sekunder tidak selalu dihasilkan. Golongan senyawa ini hanya disintesis pada saat dibutuhkan untuk menyesuaikan diri terhadap lingkungan. Fungsi senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh organisme adalah untuk melindungi organisme dalam mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan. Misalnya adaptasi diri organisme terhadap hama dan penyakit serta perubahan suhu lingkungan yang ekstrim. Menurut Yuhernita dan Juniarti, (2011), metabolit sekunder merupakan senyawa yang dibentuk pada tanaman tetapi tidak digunakan untuk pertumbuhan tanaman. Produksi golongan senyawa ini terjadi pada saat tumbuhan dalam kondisi stres.

Senyawa metabolit sekunder diklasifikasikan berdasarkan keluasan distribusinya dan kelimpahannya di alam. Penggolongan ini bertujuan untuk melakukan estimasi kasar golongan senyawa yang berhubungan dengan farmakologis. Beberapa jenis metabolit sekunder tersebut diantaranya yaitu golongan senyawa fenolik, flavonoid, saponin, minyak atsiri, tannin, alkaloid (terbatas pada beberapa genus), dan steroid (Saifudin, 2002).

#### **a. Senyawa Fenolik**

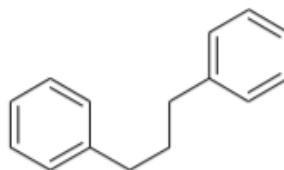
Senyawa fenolik adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil (OH) yang berikatan dengan cincin aromatik. Dengan kata lain, senyawa fenolik adalah senyawa yang sekurang-kurangnya memiliki satu gugus fenol. Banyaknya variasi gugus yang mungkin tersubstitusi pada kerangka utama fenol

menyebabkan kelompok fenolik terdiri dari sub-sub kelompok (Marinova dkk, 2005).

Berdasarkan jumlah sub unit fenol, senyawa fenolik dibagi menjadi dua yaitu fenol sederhana dan polifenol. Kelompok fenol sederhana juga disebut dengan asam fenolik atau fenol dengan gugus karboksil yang mempunyai fungsi spesifik, sedangkan polifenol adalah kelompok yang memiliki cincin fenol lebih dari dua (Gunawan dkk, 2016). Berdasarkan penelitian, senyawa golongan fenolik menunjukkan aktivitas antioksidan yang potensial. Korelasi antara kadar senyawa golongan fenolik atau flavonoid dengan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sangat tinggi (Wahdaningsih dkk, 2011).

#### **b. Senyawa Flavonoid**

Flavonoid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan dalam jaringan tumbuhan, dalam bentuk struktur dan fungsi yang berbeda. Senyawa flavonoid juga merupakan kelompok senyawa fenolik dengan rumus kimia  $C_6-C_3-C_6$ . Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan satu cincin heterosiklik yang mengandung oksigen. Struktur dasar senyawa flavonoid dapat disajikan pada Gambar 2.2 :

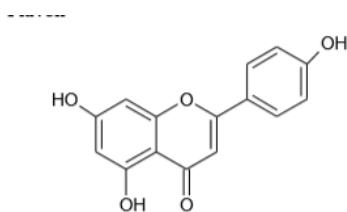


**Gambar 2.2 Struktur Dasar Flavonoid (Gunawan dkk, 2016).**

Senyawa flavonoid memiliki beberapa farmakologis seperti aktifitas antioksidan, antiinflamasi, antialergi, antivirus dan juga antikanker dari senyawa kaempferol, myricetin, apigenin, luteolin, vitexin dan isovitexin. Selain itu, kelompok flavonoid tersebut dapat melindungi dari kerusakan hati dan katarak (Tapas dkk, 2008). Senyawa flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Gunawan dkk, 2016).

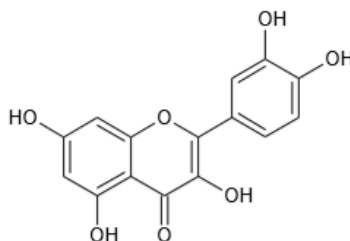
Jenis-jenis flavonoid adalah sebagai berikut :

#### 1. Flavon



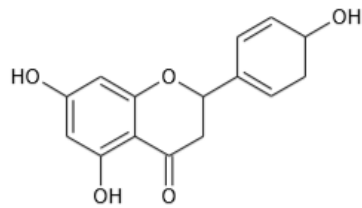
#### 2. Flavonol

Senyawa-senyawa ini beragam sebagai akibat perbedaan pada posisi Gugus –OH pada fenolnya.



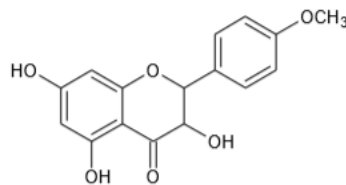
#### 3. Flavonon

Jenis flavonoid ini mirip dengan jenis flavonoid flavon tetapi pada flavanol tidak memiliki ikatan rangkap pada cincin C.

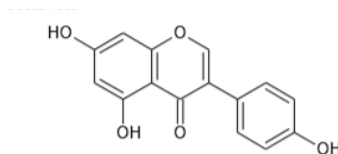


#### 4. Flavanonol

Sama halnya dengan flavonoid flavanon, jenis ini mirip dengan flavonol tetapi dengan struktur dasar flavan yang tidak memiliki ikatan rangkap pada cincin C.



#### 5. Isoflavon



### c. Senyawa Alkaloid

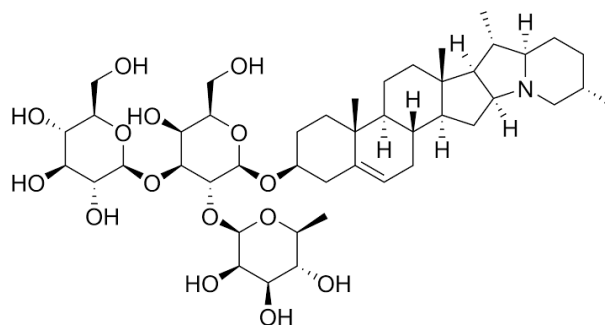
Alkaloid adalah keluarga besar lebih dari 15.000 nitrogen yang mengandung metabolit sekunder yang ditemukan pada sekitar 20% spesies tanaman vaskular. Atom nitrogen dalam zat alkaloid ini biasanya merupakan bagian dari cincin heterosiklik, sebuah cincin yang mengandung nitrogen dan atom karbon. Sesuai dengan namanya, sebagian besar alkaloid bersifat basa, umumnya berada pada nilai pH 7,2 (Anulika dkk, 2016).

Alkaloid menunjukkan sifat farmakologis bersifat bioaktif lemah hingga kuat. Alkaloid yang bersifat lemah bermanfaat sebagai zat rekresional, misalnya kafein dalam teh dan kopi. Alkaloid yang berefek kuat bersifat blocker atau stimulant berbagai reseptor atau protein fungsional. Alkaloid yang sangat potensial bersifat racun misalnya beberapa alkaloid dari katak. Pada bidang farmasi, obat-obatan juga seringkali dibuat dengan memodifikasi alkaloid endogen. Alkaloid ini terdistribusi luas dari tumbuhan, jamur, bakteri hingga mamalia (Saifudin, 2002).

#### **d. Saponin**

Saponin merupakan senyawa yang berasa pahit, berbusa dalam air dan larut dalam air dan alkohol dan tidak larut dalam eter. Saponin paling cocok diekstraksi dengan menggunakan metanol dan etanol (Robinson, 1995).

Saponin terdistribusi luas dalam tumbuhan dan merupakan salah satu bentuk khusus glikosida. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun yang jika dikocok kuat akan terbentuk busa. Saponin memiliki efek hemolitik dan sangat toksik jika diinjeksikan ke dalam aliran darah. Berdasarkan struktur aglikon atau sapogenin, ditemukan dua jenis saponin, yaitu tipe steroid dan triterpenoid.

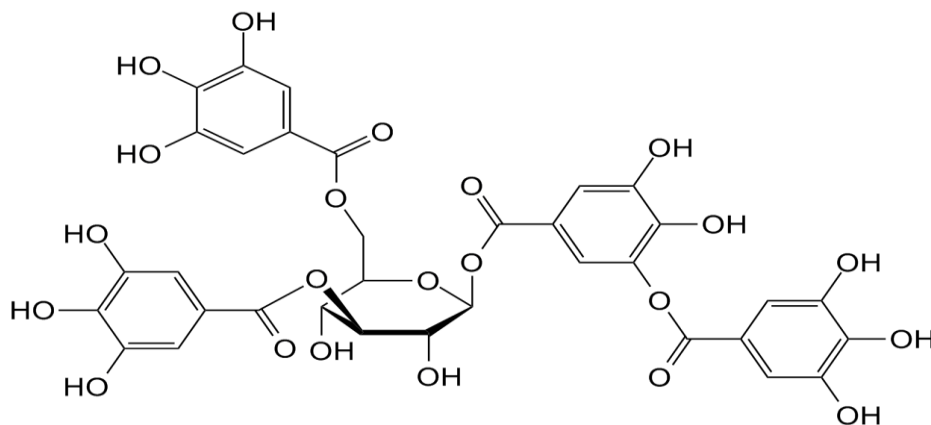


**Gambar 2.3 Struktur Senyawa Saponin**

Identifikasi senyawa saponin dapat dilakukan dengan cara menambahkan air panas (1:1) pada sampel sambil dikocok selama  $\pm$  30 menit. Ditambahkan HCl 1 N jika menimbulkan busa dan busa stabil selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, menunjukkan positif senyawa saponin.

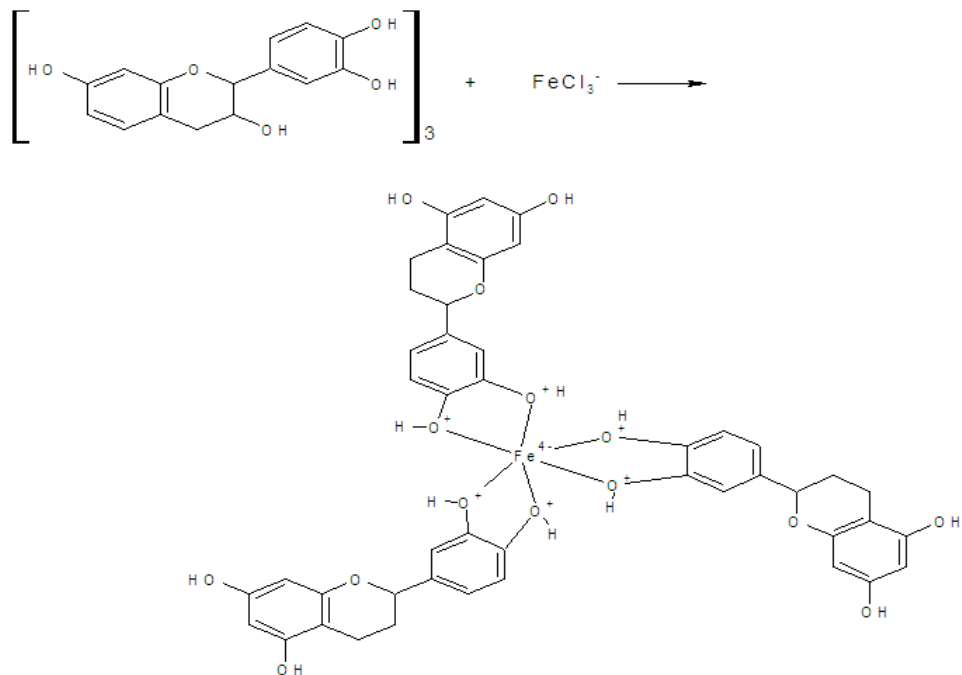
#### e. Tanin

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai asrtingen, anti diare, anti bakteri, dan anti oksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Desmiaty dkk, 2008). Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein hingga pengkhelat logam.



**Gambar 2.4 Struktur Senyawa Tanin**

Identifikasi senyawa tanin dapat menggunakan reagen  $\text{FeCl}_3$  1 % dan glatin. Reagen  $\text{FeCl}_3$  ditunjukkan dengan timbulnya warna biru tua atau hijau kehitaman, sedangkan larutan gelatin ditunjukkan dengan adanya endapan putih. Hal tersebut menunjukkan adanya senyawa tanin (Harbone, 1998).



**Gambar 2.5 Reaksi Antara Tanin Dan  $\text{FeCl}_3$**

#### **f. Terpenoid/Steroid**

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon  $\text{C}_{30}$  asiklik yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang kebanyakan berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harbone, 1998). Mekanisme kerja senyawa triterpenoid terhadap kanker yaitu dengan cara memblok siklus sel pada fase M (mitosis atau pembelahan sel).

Steroid adalah senyawa golongan lipida yang mengalami penyatuan cincin karbon. Steroid tidak mengandung asam lemak ataupun gliserol sehingga tidak mengalami penyabunan. Senyawa steroid mengandung gugus  $-\text{OH}$  sering disebut

dengan sterol dengan sifat yang cenderung lebih polar. Senyawa steroid dapat bekerja sebagai proliferasi sel kanker yaitu dengan cara memblok fase S.

Identifikasi senyawa steroid dan terpenoid secara umum menggunakan reagen Lieberman-Berchard. Uji positif untuk triterpenoid menghasilkan endapan violet (Harbone, 1987). Hasil uji positif adanya senyawa steroid dengan adanya endapan hijau biru (Robinsin, 1998)

### **2.3 Isolasi Senyawa**

Isolasi senyawa aktif dari tumbuhan merupakan suatu proses pemisahan untuk memisahkan senyawa-senyawa aktif atau komponen-komponen tertentu dari komponen yang lain. Ada beberapa teknik isolasi senyawa aktif tumbuhan. Salah satu teknik yang umum digunakan untuk mengisolasi senyawa aktif yaitu metode ekstraksi. Pada dasarnya ekstraksi memiliki pengertian yang hampir sama dengan isolasi. Menurut Harborne, (1998), ekstraksi merupakan metode pemisahan senyawa aktif atau komponen tertentu dari komponen lain berdasarkan prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut. Perpindahan massa terlarut dimulai dari pelapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Ekstraksi komponen aktif ke dalam suatu pelarut didasarkan pada kaidah *like dissolved like*, yang artinya suatu senyawa akan larut pada suatu pelarut jika tingkat kepolarannya sama.

Metode ekstraksi ada bermacam-macam. Salah satu metode ekstraksi adalah maserasi. Dalam proses maserasi, seluruh sampel direndam dengan pelarut

tertentu dan ditempatkan dalam wadah tertutup serta didiamkan pada suhu kamar pada jangka waktu tertentu (Majekodunmi, 2015).

## **2.4 Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi**

Kromatografi merupakan proses pemisahan suatu senyawa dari campurannya berdasarkan perbedaan kecepatan distribusi. Molekul-molekul yang terlarut di dalam fasa gerak, akan terdistribusi pada fasa diam. Molekul yang memiliki massa atau ukuran yang lebih besar serta memiliki ikatan yang kuat, bergerak lebih lambat. Sebaliknya molekul yang memiliki ukuran serta massa lebih kecil serta ikatan lebih lemah akan bergerak lebih cepat melewati fasa diam. Melalui kromatografi, molekul-molekul dipisahkan menurut pergerakan pada fasa diam. Komponen-komponen yang terpisah, dianalisis menggunakan detektor. Sampel yang dianalisis atau difraksinasi menggunakan metode kromatografi dapat berupa gas, cair atau padat dan dapat berkisar dalam kompleksitas dari campuran sederhana dua entantiomer. Untuk campuran multi komponen yang mengandung banyak spesies kimia yang berbeda (Scott, 2003).

Ada dua tipe kromatografi berdasarkan pengepakan fasa diam yaitu kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom. Pada kromatografi lapis tipis (KLT), fasa diam (silika gel) dilekatkan secara padat dan merata pada permukaan plat yang mendatar. Ukuran silika gel pada plat KLT adalah 40  $\mu\text{m}$ . Sedangkan pada kromatografi kolom, silika gel dipadatkan dalam kolom kromatografi. Ukuran partikel silika yang digunakan sebagai fasa diam pada

kolom kromatografi yakni 40-63  $\mu\text{m}$  (230-400 Mesh); atau 63-200  $\mu\text{m}$  (70-230 Mesh); (Saifudin, 2002).

Jenis-jenis metode kromatografi adalah:

### **1. Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)**

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau yang biasa dikenal dengan *Hight performance Liquid Chromatography (HPLC)* merupakan metode pemisahan yang dilakukan untuk sampel yang berbentuk larutan. Metode kromatografi ini dapat mengungkap secara kualitatif ataupun kuantitatif terhadap sampel yang dianalisis. Fasa diam atau kolom terdiri dari fasa normal dan fasa terbalik. Fasa normal adalah kolom yang fasa diam memiliki sifat polar, sedangkan fasa geraknya bersifat non polar. Fasa terbalik merupakan kolom yang terdiri dari fasa diam bersifat non polar dan fasa geraknya bersifat polar.

Cara kerja kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT) yaitu pompa akan menarik fasa gerak untuk melarutkan sampel, dan sampel yang telah larut pada fasa gerak akan bergerak melewati kolom. Pada saat fasa gerak melewati kolom, senyawa yang memiliki sifat kepolaran sama dengan kolom akan cenderung tertahan lebih lama pada kolom dibandingkan senyawa yang memiliki kepolaran berbeda. Komponen-komponen senyawa yang terpisah, terekam oleh detektor dan akan ditampilkan pada personal komputer (PC) dalam bentuk waktu retensi, panjang gelombang, dan bentuk picknya.

### **2. Kromatografi Cair Vakum (KCV)**

Kromatografi cair vakum atau sering disebut VLC (*vacuum liquid chromatography*) merupakan suatu metode modifikasi kromatografi konvensional

untuk fraksinasi ekstrak yang cepat (Dhanarasu, 2012). Kolom dengan vakum digunakan untuk mempercepat proses kromatografi yang dibantu dengan pompa vakum yang menekan aliran *solvent* sehingga interaksi/retensi dengan adsorben senyawa-senyawa lebih cepat. Efisiensi pemisahan akan lebih baik jika kolom tipe ini disambung dengan pipa yang menghubungkan pre kolom yang berisi serbuk ekstrak. Jika preparasi dan optimasi dilakukan secara baik maka fase diam yang digunakan lebih sedikit, dan ekstrak yang dipisahkan bisa lebih banyak (Saifudin, 2002).

### **3. Kromatografi Gas**

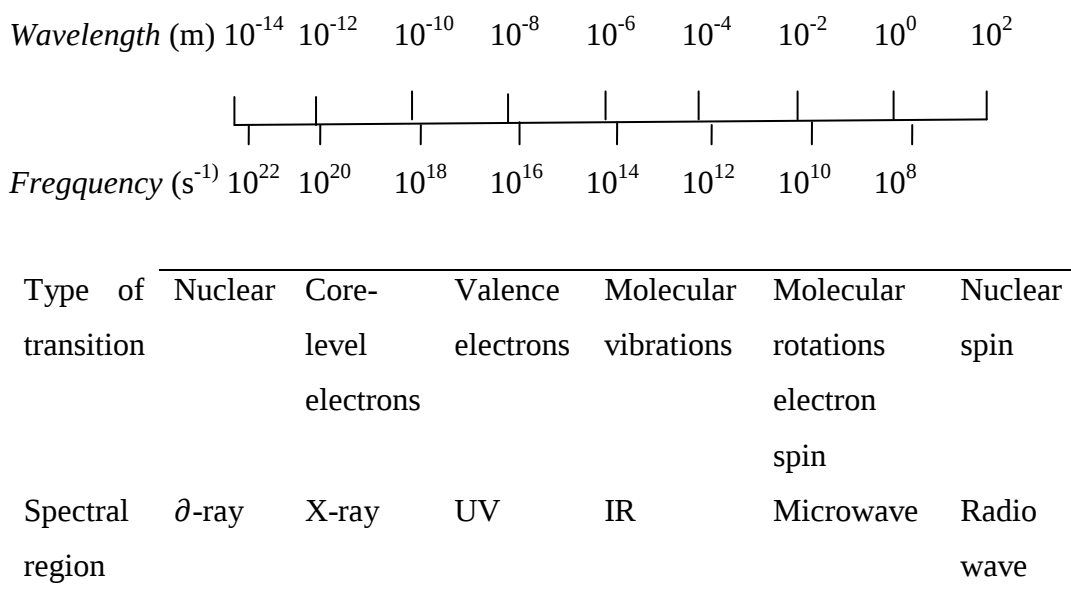
Kromatografi gas merupakan suatu metode kromatografi, dimana fasa geraknya berupa gas. Gas yang digunakan sebagai fasa gerak biasanya berupa gas inert seperti helium, atau gas yang tidak reaktif seperti nitrogen. Sampel yang digunakan dalam bentuk larutan yang mudah menguap tanpa melalui dekomposisi. Fasa diam yang digunakan berupa lapisan cairan mikroskopis atau polimer di atas padatan pendukung fasa diam, yang berada di dalam tabung kaca atau logam yang disebut kolom.

### **2.5 Identifikasi Senyawa Secara Spektroskopi**

Spektrofotometri merupakan metode analisis kimia yang berdasarkan interaksi energi cahaya dengan materi. Alat untuk analisis secara spektrofotometri disebut spektrofotometer, yang dapat digunakan untuk menganalisa suatu senyawa secara kuantitatif maupun kualitatif (Suharmanto dan Kurniawan, 2013). Radiasi elektromagnetik atau cahaya merupakan bentuk energi yang sifatnya

digambarkan oleh sifat gelombang dan partikel. Radiasi elektromagnetik tersebut dapat berupa radiasi sinar  $\gamma$ , sinar-X (X-ray), UV-Vis (ultra ungu-tampak), infra merah (IR), gelombang mikro, dan gelombang radio (Harvey, 2000).

Berdasarkan panjang gelombang, radiasi elektromagnetik dapat dibagi menjadi beberapa jenis yang ditunjukkan pada Gambar 2.7



**Gambar 2.6 Jenis Radiasi Elektromagnetik Dan Panjang Gelombangnya (Harvey, 2000).**

## 1. Spektroskopi UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan suatu metode analisis berdasarkan interaksi antara radiasi elektromagnetik ultra violet dekat (190-380 nm) dan sinar tampak (380-780 nm) dengan suatu materi (senyawa). Prinsip kerja spektrofotometri ini berdasarkan penyerapan sinar ultraviolet maupun sinar tampak yang menyebabkan terjadinya transisi elektron (perpindahan elektron dari tingkat energi yang rendah ke tingkat energi yang lebih tinggi). Apabila dua buah atom saling berikatan dan membentuk molekul maka akan terjadi tumpang tindih

dua orbital dari kedua atom yang masing-masing mengandung satu elektron dan kemudian terbentuk orbital molekul. Hukum kuantitatif yang berhubungan dengan hal tersebut yakni hukum Lambert- Beer. Menurut hukum Lambert-Beer

$$T = I_t / I_o = 10^{-\epsilon \cdot c \cdot b} \quad (2.1)$$

$$A = \log I/T = \epsilon \cdot c \cdot b \quad (2.2)$$

Keterangan:

T = transmitan

I<sub>o</sub> = intensitas sinar yang datang

I<sub>t</sub> = intensitas radiasi yang diteruskan

€ = absorptansi molar (Lt.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>1</sup>)

c = konsentrasi (mol.Lt<sup>-1</sup>),

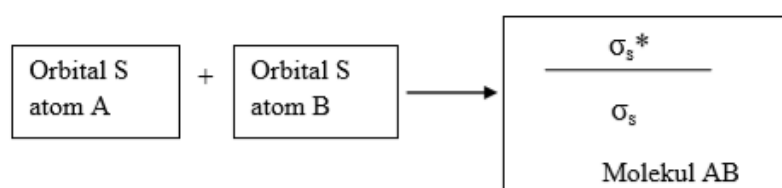
b = tebal larutan (cm)

A = absorban .

Spektrum UV maupun tampak terdiri dari pita absorpsi yang lebar pada daerah panjang gelombang yang lebar. Ini disebabkan terbaginya keadaan dasar dan keadaan eksitasi sebuah molekul dalam sub-sub tingkat rotasi dan vibrasi. Transisi elektronik dapat terjadi dari subtingkat apa saja dari keadaan dasar ke subtingkat apa saja dari keadaan eksitasi. Karena berbagai transisi ini berbeda energi sedikit sekali, maka panjang gelombang absorpsinya juga berbeda sedikit dan menimbulkan pita lebar yang tampak dalam spektrum itu. Di samping pita-pita spektrum visibel disebabkan terjadinya tumpang tindih energi elektronik dengan energi lainnya (translasi, rotasi, vibrasi) juga disebabkan adanya faktor lain sebagai faktor lingkungan kimia yang diberikan oleh pelarut yang dipakai.

Pelarut akan sangat berpengaruh mengurangi kebebasan transisi elektronik pada molekul yang dipakai radiasi elektromagnetik. Oleh karena itu, spektrum zat dalam keadaan uap akan memberikan pita spektrum yang sempit. Panjang gelombang terjadi eksitasi elektronik yang memberikan absorban maksimum disebut sebagai panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{\text{maks}}$ ). Penentuan panjang gelombang maksimum yang tetap dapat dipakai untuk identifikasi molekul yang bersifat karakteristik-karakteristik sebagai data sekunder. Dengan demikian spektrum visibel dapat dipakai untuk tujuan analisis kualitatif (data sekunder) dan kuantitatif. Analisis kualitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis hanya dipakai untuk data sekunder atau data pendukung. Pada analisis kualitatif dengan metode spektrofotometri UV-Vis yang dapat ditentukan ada dua yaitu pemeriksaan kemurnian spektrum UV-Vis dan penentuan panjang gelombang maksimum.

Bila molekul menyerap sinar ultraviolet pada energi tertentu, maka akan ada elektron yang dipromosikan ke tingkat energi yang lebih tinggi, dan elektron-elektron lain tidak terpengaruh. Karena elektron dalam molekul memiliki energi yang tidak sama, maka energi yang diserap dalam proses eksitasi dapat menyebabkan terjadinya satu atau lebih transisi tergantung pada jenis elektron yang terlihat (Harmita, 2006).

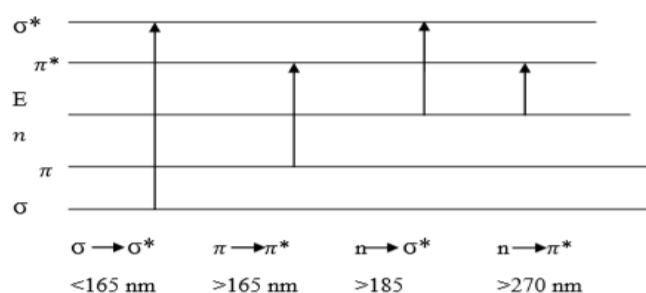


**Gambar 2.7 Interaksi Orbital Membentuk Molekul**

Orbital S atom A dan B berinteraksi antara satu dengan yang lainnya, menghasilkan dua orbital molekul dalam molekul AB. Satu orbital yang dihasilkan berenergi lebih rendah dan satu orbital lainnya mempunyai energi lebih tinggi dari pada orbital S asalnya. Orbital molekul yang memiliki energi lebih rendah disebut orbital ikatan ( $\sigma$ ) dan orbital molekul yang memiliki energi lebih tinggi disebut orbital antiikatan ( $\sigma^*$ ).

Keadaan dasar suatu molekul organik mengandung elektron-elektron valensi dalam tiga jenis utama orbital molekul, yaitu orbital sigma ( $\sigma$ ); orbital pi ( $\pi$ ); dan orbital elektron bebas ( $n$ ). Baik orbital  $\sigma$  maupun orbital  $\pi$  dibentuk dari tumpang tindih dua orbital atom. Oleh karena itu masing-masing orbital molekul ini mempunyai suatu orbital  $\sigma^*$  atau  $\pi^*$  antiikatan yang berkaitan dengannya. Transisi-transisi elektron mencakup promosi suatu elektron dari salah satu dari tiga keadaan dasar  $\sigma$  ; atau  $n$  ke salah satu dari dua keadaan eksitasi ( $\sigma^*$  atau  $\pi^*$ ) (Harmita, 2006).

Transisi-transisi tersebut diklasifikasikan sebagai berikut :



**Gambar 2.8 Transisi Elektron**

Sistem (gugus atom) yang menyebabkan terjadinya absorpsi cahaya disebut kromofor. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  adalah

sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul  $\sigma$ . Senyawa yang hanya mempunyai orbital molekul  $\sigma$  adalah molekul organik jenuh yang tidak mempunyai atom dengan pasangan elektron bebas, seperti C-C dan C-H. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi  $n \rightarrow \sigma^*$  adalah sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul molekul tak mengikat ( $n$ ) dan  $\sigma$ . Senyawa yang hanya mempunyai orbital molekul  $n$  dan  $\sigma$  adalah molekul organik jenuh yang mempunyai satu atau lebih atom dengan pasangan elektron sunyi, seperti C-O; C-S; C-N; C-Cl. Kromofor yang menyebabkan terjadinya transisi  $\pi \rightarrow \pi^*$  adalah sistem yang mempunyai elektron pada orbital molekul  $\pi$ . Senyawa yang hanya mempunyai orbital molekul  $\pi$ , seperti C=C; C $\equiv$ C. Kromofor yang menyebabkan transisi  $n \rightarrow \pi^*$  adalah sistem yang mempunyai elektron baik pada orbital molekul tak mengikat (bebas) maupun pada  $\pi$ . Senyawa yang mempunyai orbital molekul  $n$  maupun  $\pi$  adalah senyawa yang mengandung atom yang mempunyai pasangan elektron sunyi. Contoh jenis kromofor tersebut adalah C=O; dan C=C-O (Harmita, 2006)

Panjang gelombang cahaya UV atau tampak tergantung pada mudahnya eksitasi elektron. Molekul-molekul yang memerlukan lebih banyak energi untuk bertransisi, akan menyerap pada panjang gelombang yang lebih pendek. Molekul yang memerlukan energi yang lebih kecil akan menyerap panjang gelombang yang lebih besar. Sehingga senyawa yang menyerap cahaya dalam daerah tampak (senyawa berwarna) memiliki elektron yang lebih mudah bertransisi dari pada senyawa yang menyerap pada panjang gelombang UV yang lebih pendek (Kristianingrum, 2014).

## 2. Spektroskopi IR

Spektroskopi inframerah (*infrared* atau IR) merupakan suatu analisis senyawa organik atau anorganik yang berdasarkan pada interaksi antara gelombang elektromagnetik inframerah (IR) dengan partikel penyusun materi. Adanya energi dari gelombang elektromagnetik inframerah menyebabkan terjadinya vibrasi molekul pada materi tersebut.

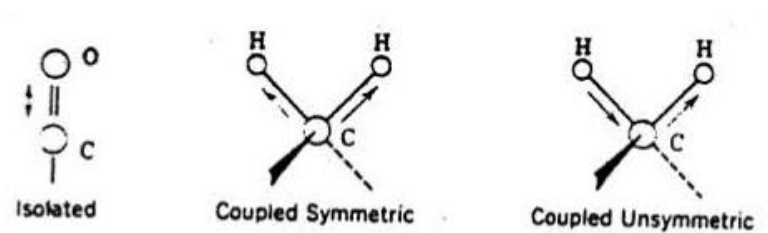
Analisis secara spektroskopi inframerah digunakan untuk menganalisis gugus fungsi yang terdapat pada zat yang diuji. Setiap gugus fungsi akan memberikan puncak-puncak yang tetap, informasi inilah yang digunakan untuk menganalisis secara kualitatif pada zat tersebut (Harvey, 2000). Karakteristik serapan IR yang dikemukakan oleh (McMurry, 2008) pada Tabel 2.1.

**Tabel 2.1. Karakteristik Serapan IR dari Beberapa Gugus Fungsi.**

| Gugus           | Serapan ( $\text{cm}^{-1}$ ) | Intensitas |
|-----------------|------------------------------|------------|
| Alkana          |                              |            |
| C-H             | 2850-2960                    | Sedang     |
| Alkena          |                              |            |
| =C-H            | 3020-3100                    | Sedang     |
| C=C             | 1640-1680                    | Sedang     |
| Alkil halida    |                              |            |
| C-Cl            | 600-800                      | Kuat       |
| C-Br            | 500-600                      | Kuat       |
| Alkohol         |                              |            |
| O-H             | 3400-3650                    | Kuat       |
|                 | 1660-2000                    | Lemah      |
| Cincin Aromatik | 1450-1600                    | Sedang     |

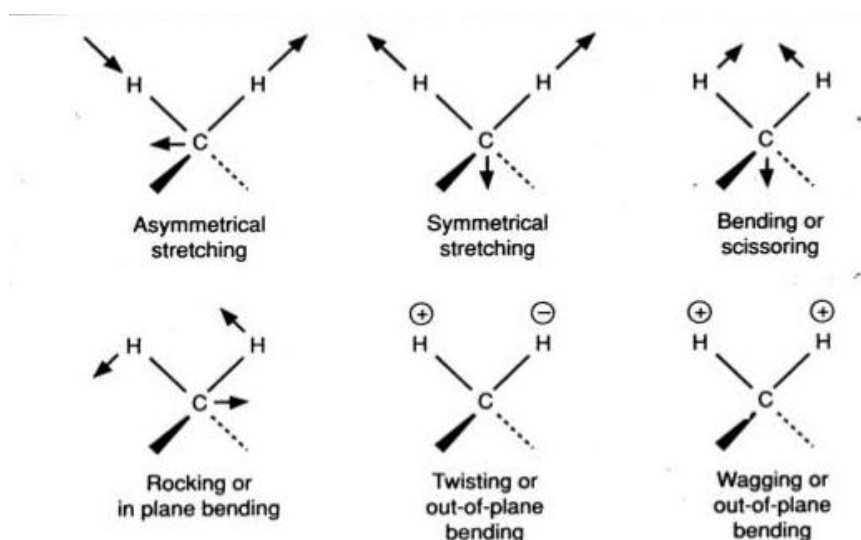
|                 |           |        |
|-----------------|-----------|--------|
| Amina           |           |        |
| N-H             | 3300-3500 | Sedang |
| C-N             | 1030-1230 | Sedang |
| Karbonil        |           |        |
| C=O             | 1670-1780 | Kuat   |
| Nitril          |           |        |
| C≡N             | 2210-2260 | Sedang |
| Nitro           |           |        |
| NO <sub>2</sub> | 1540      | Kuat   |

Prinsip dari spektrofotometer IR adalah ketika suatu molekul dari suatu senyawa diberikan energi radiasi inframerah, maka molekul tersebut akan mengalami vibrasi dengan syarat energi yang diberikan terhadap molekul cukup untuk mengalami vibrasi. Ada dua macam vibrasi yaitu vibrasi regangan atau stretching dan vibrasi tekuk atau bending. Vibrasi regangan adalah pergerakan atom yang teratur sepanjang sumbu ikatan antara dua atom sehingga jarak antara atom dapat bertambah atau berkurang. Vibrasi stretching ada dua tipe yaitu stretching asimetris dan stretching simetris. Stretching simetris merupakan unit struktur bergerak bersamaan dan searah dalam satu bidang datar. Stretching asimetri merupakan unit struktur bergerak bersamaan dan tidak searah tetapi dalam satu bidang datar (Sadaruddin, 2014).



**Gambar 2.9 Bentuk Vibrasi Stretching**

Vibrasi tekuk (bending) adalah pergerakan atom yang menyebabkan perubahan sudut ikatan antara dua ikatan atau pergerakan dari sekelompok atom terhadap atom lainnya. Ada 4 tipe vibrasi bending yaitu vibrasi goyangan (rocking), vibrasi guntingan (scissoring), vibrasi pelintiran (twisting), dan vibrasi kibasan (wagging).



**Gambar 2.10 Bentuk vibrasi bending**

Suatu ikatan dapat mengalami lebih dari satu macam vibrasi. Oleh karena itu suatu ikatan tertentu dapat menyerap energi lebih dari satu panjang gelombang. Misalnya, suatu ikatan O-H menyerap energi pada kira-kira  $3330\text{ cm}^{-1}$  (vibrasi ulur/regangan). Selain itu ikatan O-H juga menyerap pada kira-kira  $1250\text{ cm}^{-1}$  (vibrasi tekuk) (Sadaruddin, 2014).

## 2.6 Radikal Bebas dan Antioksidan

Radikal bebas merupakan suatu atom yang memiliki pasangan elektron bebas dan pasangan electron tersebut kehilangan satu elektronnya dan menjadi

tidak berpasangan dalam orbital terluarnya. Kondisi ini menyebabkan atom tersebut tidak stabil sehingga sangat reaktif. Radikal ini cenderung menyebabkan reaksi berantai yang apabila terjadi di dalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus menerus. Dampak yang lebih umum dari aktivitas radikal bebas ini yakni terbentuknya sel-sel yang abnormal. Kumpulan sel-sel abnormal membentuk sel kanker.

Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang disebabkan oleh faktor stress, radiasi, asap rokok dan polusi lingkungan. Faktor-faktor ini menyebabkan sistem pertahanan tubuh tidak memadai, dan dapat meningkatkan terbentuknya sel-sel abnormal. Biomolekul, seperti DNA, protein, dan lipoprotein di dalam tubuh dapat mengalami kerusakan sehingga memicu terjadinya penyakit degeneratif seperti kanker, jantung, artritis, katarak, diabetes dan hati. Untuk mencegah aktivitas radikal bebas yang menimbulkan kejadian oksidasi abnormal maka tubuh memerlukan zat antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas (Wahdaningsih dkk., 2011). Bentuk perlindungan dari zat antioksidan yakni meredam aktivitas radikal bebas melalui pembentukan kompleks.

Menurut Filbert dkk, (2014) penyakit degeneratif disebabkan karena antioksidan yang ada di dalam tubuh tidak mampu menetralkan peningkatan konsentrasi radikal bebas. Oleh karena itu dibutuhkan tambahan zat antioksidan dari luar tubuh. Misalnya; asam fenolik, flavonoid, karoten, vitamin E (tokoferol), vitamin C, asam urat, bilirubin dan albumin. Zat-zat gizi mineral seperti mangan,

seng, tembaga dan selenium (Se) juga berperan sebagai antioksidan (Kurniasih dkk., 2015).

## **2.7 Metode Uji Aktivitas Antioksidan**

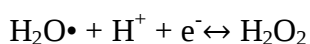
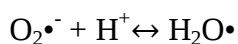
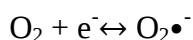
Penentuan aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu, ABTS (TEAC), voltammetri, dan 2,2-Difenil-1- Pikrilhidrazil (DPPH). Metode tersebut bersifat sederhana dan peralatan yang dibutuhkan tidak terlalu mahal dibandingkan dengan metode antioksidan yang lain seperti *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity* (CUPRAC), *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP), dan *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) (Kurniasih dkk, 2015).

### **2.7.1 Metode ABTS/TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*)**

ABTS merupakan suatu metode yang menggunakan prinsip inhibisi yaitu sampel ditambahkan pada sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel. Metode TEAC menggunakan senyawa 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazole-6-sulfonic acid) sebagai sumber penghasil radikal bebas (Kurniasih dkk., 2015). Uji ABTS menggunakan radikal bebas dengan senyawa 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid), yang dihasilkan saat substrat ABTS teroksidasi dengan kalium persulfat. ABTS memiliki warna biru/hijau dengan spektrum serapan maksimum pada panjang gelombang 734 nm dalam air (Liang and Kitts, 2014).

### 2.7.2 Metode Voltammetri

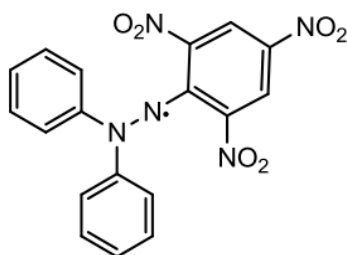
Pengujian anti radikal bebas senyawa bahan alam/sintesis dapat dilakukan secara voltammetri. Analisis voltammetri, sensitif serta efektif untuk penentuan aktivitas antioksidan dengan merekam reduksi oksigen elektrokimia pada elektroda film merkuri (atau elektroda gelas karbon) (Korotkova dkk, 2008). Voltammetri adalah metode elektrokimia dengan pengukuran arus sebagai fungsi potensial. Metode voltammetri mengaplikasikan suatu potensial pada sebuah sel elektrokimia dan arus yang mengalir melalui sel diukur sebagai fungsi dari potensial. Plot arus sebagai fungsi potensial disebut voltammogram. Voltammogram menampilkan informasi kualitatif dan kuantitatif tentang spesi yang terlibat pada reaksi oksidasi dan reduksi (Harvey, 2000). Dalam metode voltametri, elektroreduksi oksigen (ER  $O_2$ ) yang terjadi pada elektroda terjadi dalam beberapa tahap mekanisme yaitu :



### 2.7.3 Metode DPPH

2,2 difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) merupakan salah satu metode uji peredaman warna radikal bebas untuk menentukan aktivitas antioksidan dalam sampel dengan melihat kemampuannya dalam menangkal radikal bebas DPPH.

Sumber radikal bebas dari metode ini adalah senyawa 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil. Prinsip pengujiannya adalah adanya donasi atom hidrogen dari substansi yang diujikan kepada radikal DPPH menjadi senyawa non radikal difenil-1-pikrilhidrazin yang ditunjukkan oleh perubahan warna. Kemampuan penangkapan radikal berhubungan dengan kemampuan komponen senyawa dalam menyumbangkan elektron atau hidrogen. Setiap molekul yang dapat menyumbangkan elektron atau hidrogen akan bereaksi dan akan memudahkan DPPH. Intensitas warna DPPH akan berubah dari ungu menjadi kuning oleh elektron yang berasal dari senyawa antioksidan. Konsentrasi DPPH pada akhir reaksi tergantung pada konsentrasi awal dan struktur komponen senyawa penangkap radikal (Kurniasih dkk, 2015).



**Gambar 2.11 Senyawa DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Tirzitis and Bartosz, 2010).**

Kemudian untuk menghitung aktivitas penghambatan radikal dapat dihitung dengan rumus persentase inhibisi (kemampuan meredam radikal) DPPH.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (\text{II.3})$$

Selanjutnya dilakukan perhitungan  $IC_{50}$  yang merupakan konsentrasi sampel untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya inhibisi dengan konsentrasi sampel. Hasil

persentase inhibisi tersebut dimasukkan dalam persamaan linier dengan persamaan :

$$Y = aX + b \quad (2.4)$$

Dengan,  $Y$  = persentase inhibisi.

$A$  = gradien.

$X$  = konsentrasi ( $\mu\text{g/ml}$ ).

$B$  = Konstanta.

Untuk menghitung nilai  $IC_{50}$ , persamaannya menjadi:

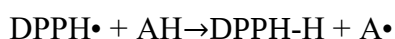
$$50 = aX + b \quad (2.5)$$

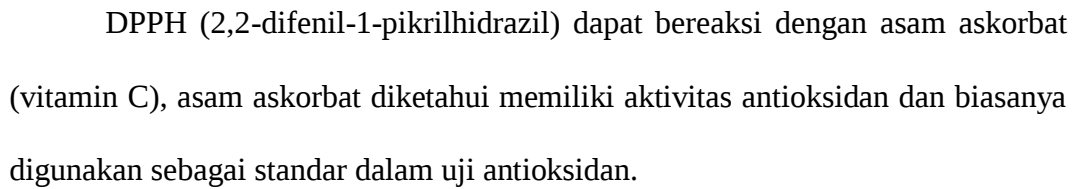
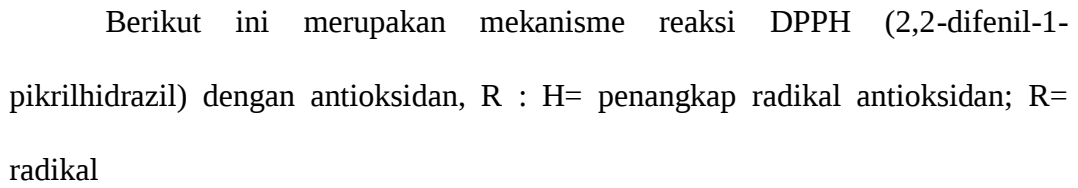
$$X = \frac{50 - b}{a} \quad (2.6)$$

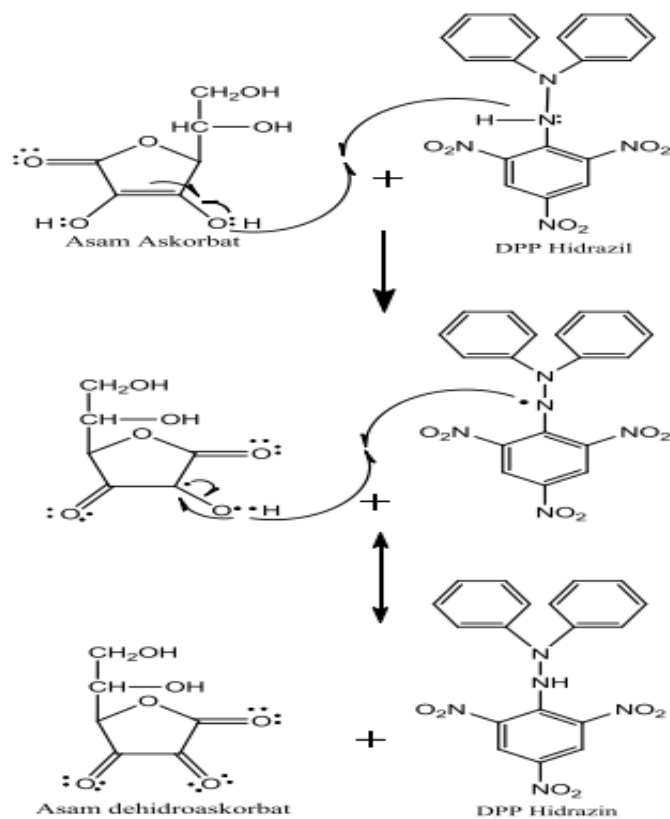
Harga  $X$  adalah  $IC_{50}$  dengan satuan  $\mu\text{g/ml}$ .  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Paputungan dkk, 2017). Berdasarkan standar tingkat aktivitas antioksidan, senyawa yang termasuk kategori sangat tinggi memiliki nilai  $IC_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ , kategori tinggi bila memiliki nilai  $IC_{50}$  10-100  $\mu\text{g/mL}$ , dan kategori tidak aktif bila nilai  $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$ .

## 2.8 Mekanisme Reaksi Senyawa Antioksidan dengan DPPH

Senyawa antioksidan dapat bereaksi dengan  $DPPH^\bullet$  (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dan dalam bentuk radikalnya DPPH menyerap pada 517 nm. Namun setelah direduksi dengan antioksidan (AH) atau spesies radikal (R) maka penyerapannya akan hilang.







**Gambar 2.13 Mekanisme Vitamin C dan DPPH**

Dari mekanisme reaksi di atas, reaksi awal menunjukkan bahwa pasangan elektron atom H dari gugus  $\text{-OH}$  pada senyawa asam askorbat dan atom H dari gugus  $\text{-NH}$  pada senyawa radikal DPPH saling melepas elektron dan pasangan elektron atom O dan ikatan rangkap pada senyawa asam askorbat saling menarik elektron sehingga asam askorbat menjadi radikal. Lalu pada reaksi selanjutnya terjadi donor pasangan elektron pada senyawa asam askorbat pada atom O dan donor elektron atom H pada senyawa asam askorbat saling menarik elektron atom N pada senyawa DPPH. Asam askorbat dapat kembali menjadi stabil dengan cara mendonorkan elektron dari ikatan rangkap pada atom karbon sehingga senyawa asam askorbat teroksidasi menjadi senyawa asam dehidroaskorbat dan senyawa

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) tereduksi menjadi senyawa DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin).