

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar belakang masalah

Sumber radikal bebas mudah dijumpai dalam lingkungan sehari-hari, seperti asap rokok, obat tertentu, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain (Winarsi, 2007). Radikal bebas merupakan atom molekul yang memiliki kereaktifan tinggi, hal ini dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan (Grossman, 2008). Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya untuk mencapai kestabilan, selain itu juga dapat memicu timbulnya penyakit degeneratif seperti patogenesis diabetes, kerusakan hati, inflamasi, kanker, gangguan jantung, gangguan syaraf dan proses penuaan (Onkar *et al.*, 2012). Oleh sebab itu, dibutuhkan antioksidan yang dapat menghambat radikal bebas sehingga dapat menghentikan kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas tersebut (Sasikumar *et al.*, 2009).

Sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun alami. Antioksidan sintetik misalnya BHA (*butylated hydroxy anisole*), BHT (*butylated hydroxy toluene*), PG (*propyl gallate*), dan TBHQ (*tertiary butyl hydroquinone*) (Widowati dkk., 2005). Penggunaan antioksidan sintetik selain memberikan efek manfaat, ternyata dalam jangka waktu lama dan pemberian yang terus menerus dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya, salah satunya yaitu dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et al.*, 2000). Akhir-akhir ini terjadi peningkatan pesat dalam pencarian antioksidan alami untuk menggantikan antioksidan sintetik. Flavonoid sebagai senyawa metabolit sekunder yang terdapat

dalam tumbuhan berguna sebagai penangkap radikal bebas, yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Nishantini *et al.*, 2012).

Tanaman jeruk nipis merupakan salah satu tanaman obat keluarga yang banyak terdapat di tengah masyarakat dan digunakan sebagai bumbu masakan maupun untuk obat-obatan dari bagian air perasan buah jeruk nipisnya. Kandungan kimia yang terdapat dalam air perasan jeruk nipis diantaranya adalah flavonoid, asam sitrat, dan limonen (Kurnia, 2014). Uji pendahuluan yang sudah dilakukan terhadap air perasan jeruk nipis memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas DPPH sebesar $EC_{50} = 6,03\%$ (Aprilano, 2013). Penelitian terhadap ekstrak daun jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sudah dilakukan dan diperoleh nilai IC_{50} sebesar 93,41 ppm yang tergolong kuat (Fajarwati, 2013), dan terhadap ekstrak etanolik kulit buah jeruk nipis diketahui bahwa kulit buah jeruk nipis memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas DPPH sebesar $IC_{50} = 54,458 \mu\text{g/mL}$ (Khasanah dkk., 2014). Penelitian Kaur *and* Mondal (2014), menunjukkan bahwa dalam buah jeruk nipis memiliki kandungan flavonoid total sebesar 39,03 mg / 100 g berat segar. Dalam pencarian literatur mengenai aktivitas antioksidan flavonoid dari air perasan jeruk nipis menggunakan metode ABTS sejauh ini masih jarang ditemukan.

Berdasarkan latar belakang yang didukung dengan penelitian sebelumnya, maka perlu dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan pada air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dengan menggunakan metode ABTS (2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid) dan penetapan kadar flavonoid totalnya.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka perumusan masalahnya adalah :

1. Apakah air perasan jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan dengan metode ABTS, dan seberapa besar potensi antioksidan yang ditunjukkan oleh nilai IC_{50} ?
2. Apakah air perasan jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid?
3. Seberapa besar kadar flavonoid total dari air perasan jeruk nipis menggunakan metode spektrokolorimetri dengan pereaksi $AlCl_3$ pada panjang gelombang tertentu?

C. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu :

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai air perasan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) yang memiliki aktivitas antioksidan alami.
2. Menambah ilmu pengetahuan tentang antioksidan dalam bidang kesehatan serta referensi bagi penelitian selanjutnya.

D. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui adanya aktivitas antioksidan air perasan jeruk nipis, dan seberapa besar potensi antioksidan yang ditunjukkan oleh nilai IC_{50} .
2. Mengetahui ada tidaknya senyawa flavonoid dalam air perasan jeruk nipis.
3. Menentukan kadar flavonoid total dari air perasan jeruk nipis menggunakan metode spektrokolorimetri dengan pereaksi $AlCl_3$ pada panjang gelombang tertentu.

E. Tinjauan Pustaka

1. Tanaman Jeruk Nipis

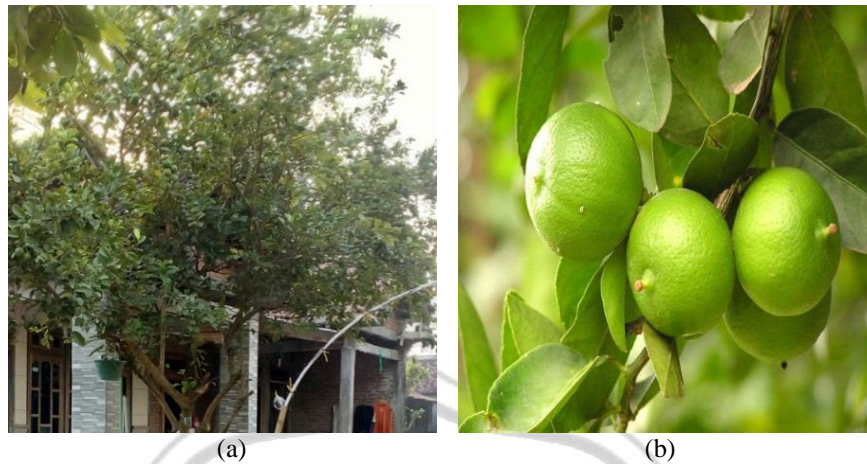
a. Morfologi

Jeruk nipis (*C. aurantifolia*) termasuk salah satu jenis *citrus* (jeruk), jeruk nipis termasuk jenis tumbuhan perdu yang banyak memiliki dahan dan ranting. Batang pohonnya berkayu ulet dan keras. Sedang permukaan kulit luarnya berwarna tua dan kusam. Tanaman jeruk nipis pada umur 2,5 tahun sudah mulai berbuah. Bunganya berukuran kecil-kecil berwarna putih dan buahnya berbentuk bulat sebesar bola pingpong berwarna (kulit luar) hijau atau kekuning-kuningan. Buah jeruk nipis yang sudah tua rasanya asam (Thomas, 1989; Rukmana, 1996; Septiatin, 2009).

b. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dalam sistematika tanaman (taksonomi) adalah sebagai berikut (Van Steenis, 1981; Rukmana, 1996):

Kingdom : Plantae
Divisio : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Sub-class : Rosidae
Ordo : Sapindales
Familia : Rutaceae
Genus : Citrus
Species : *Citrus aurantifolia* Swingle.



Gambar 1. Tanaman jeruk nipis (a) dan buah jeruk nipis (b)
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

c. Kandungan Kimia

Kandungan kimia yang ditemukan dalam jeruk nipis antara lain seperti flavonoid (meliputi: rutin, hesperidin, tangertin, naringenin, eriositrin, eriositrosida, diosmin, kuersetin), vitamin C, vitamin B₁, saponin, tanin, belerang, asam sitrun, glikosida, dammar, minyak atsiri (meliputi: nildehid, aktilaldehid, linalil asetat, geranil asetat, kadinen, lemon kamfer, felandren, limonen, sitral), asam amino (lisin, triptofan), asam sitrat, minyak terbang (Karina, 2012).

Buah jeruk nipis dalam 100 gram mengandung flavonoid sebesar 39,03 mg (Kaur *and* Mondal, 2014), vitamin C sebesar 27 mg, kalsium 40 mg, fosfor 22 mg, hidrat arang 12,4 mg, vitamin B₁ 0,04 mg, zat besi 0,6 mg, lemak 0,1 g, kalori 37 g, protein 0,8 g, dan mengandung air 86 gram (Thomas, 1989; Septiatin, 2009). Air perasan jeruk nipis memiliki kandungan kimia diantaranya flavonoid, asam sitrat, limonene (Kurnia, 2014).

d. Khasiat Tanaman

Tanaman jeruk nipis merupakan salah satu tanaman obat yang memiliki banyak manfaat dan khasiat untuk mencegah dan mengobati penyakit (Karina, 2012) antara lain: amandel, malaria, ambeien, sesak nafas, influenza, batuk, sakit panas, sembelit, terlambat datang bulan, perut mulas pada waktu haid/datang bulan, disentri, perut mulas, perut mual, menghilangkan kelelahan, menghilangkan bau badan, menghindarkan keriput pada wajah (Thomas, 1989), mengobati jerawat, kepala pusing (vertigo), suara serak, menambah nafsu makan, sakit kepala/ pusing secara tiba-tiba, mencegah rambut rontok, menghilangkan ketombe, menghentikan kebiasaan merokok, mimisan (Septiatin, 2009).

2. Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom molekul yang memiliki kereaktifan tinggi, hal ini dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan (Grossman, 2008). Secara umum, tahapan pembentukan reaksi radikal bebas melalui 3 tahapan reaksi yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Tahap inisiasi merupakan awal pembentukan radikal bebas, tahap propagasi merupakan pemanjangan rantai dan tahap terminasi merupakan bereaksinya senyawa radikal dengan radikal lain atau dengan penangkap radikal sehingga potensi propagasinya rendah (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh dan dari luar tubuh :

- a) Sumber dari dalam tubuh, yaitu: proses oksidasi yang berlebihan, proses olahraga yang berlebihan, proses peradangan akibat menderita sakit kronik atau kanker, dan stress berat.

- b) Sumber dari luar tubuh yaitu : asap rokok, udara atau lingkungan yang tercemar, radiasi matahari, dan radiasi foto terapi (penyinaran), konsumsi obat-obatan termasuk kemoterapi, pestisida dan zat kimia (Tapan, 2005).

3. Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan, namun dalam arti biokimia antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Senyawa antioksidan memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal (Tapan, 2005). Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Peran antioksidan adalah menetralisasi radikal bebas, sehingga tubuh terlindungi dari penyakit degeneratif. Oleh sebab itu, antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas (Tapan, 2005).

Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan buatan (sintetik). Antioksidan alami umumnya terdapat dalam buah-buahan dan sayuran. Komponen yang terkandung didalamnya adalah vitamin C, vitamin E, β -karoten, flavonoid, isoflavon, flavon, antosianin, katekin, isokatekin, asam lipoat, bilirubi, albumin, likopen dan klorofil (Winarsi, 2007). Antioksidan sintetik dibuat dari bahan-bahan kimia, antara lain BHA (*butylated hydroxy anisole*), BHT (*butylated hydroxy toluene*), PG (*propyl gallate*), dan TBHQ (*tertiary butyl hydroquinone*) (Widowati dkk., 2005).

Klasifikasi daya antioksidan menurut Blois (1958) dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi Daya Antioksidan (Blois, 1958)

Nilai IC ₅₀	Antioksidan
<50 ppm	Sangat kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
151-200 ppm	Lemah

4. Vitamin C

Pemerian vitamin C hablur atau serbuk putih atau agak kuning. Oleh pengaruh cahaya lambat laun menjadi berwarna gelap. Dalam keadaan kering stabil diudara, dalam larutan cepat teroksidasi. Mudah larut dalam air; agak sukar larut dalam etanol; tidak larut dalam kloroform, dalam eter dan dalam benzena (Depkes, 1995).

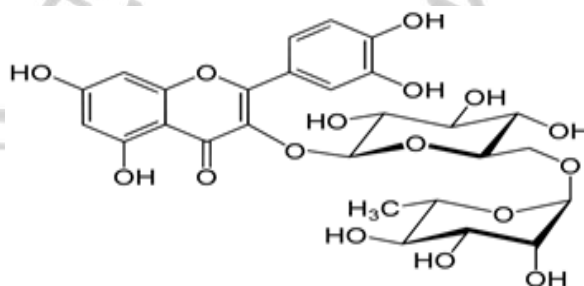
Vitamin C sangat banyak dijumpai pada tanaman sebagai L-asam askorbat dan sumber vitamin C di alam adalah buah-buahan dan sayur-sayuran. Vitamin ini sangat labil terhadap suhu dan oksigen. Vitamin C atau asam askorbat mampu bereaksi dengan radikal bebas kemudian mengubahnya menjadi radikal askorbil yang nantinya segera berubah menjadi dehidroaskorbat (Zakaria, 1996).

5. Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik (Markham, 1988). Flavonoid yang banyak ditemukan dalam sayur-sayuran dan

buah-buahan, dan dilaporkan sebagai antioksidan berpotensi lebih kuat dibandingkan dengan vitamin C dan E (Amic *et al.*, 2003; Winarsi, 2007). Flavonoid termasuk senyawa potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti-inflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik (Marinova *and* Batcharov, 2011).

Senyawa flavonoid mampu berperan sebagai antioksidan karena dapat berperan sebagai *free radical scavengers* yang mampu melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya, dimana atom hidroksil tersebut akan berikatan dengan radikal bebas sehingga menjadi netral kembali. Flavonoid akan mengalami resonansi dan radikal bebas yang telah stabil menjadi bereaksi sehingga tidak merusak lipid, protein atau DNA (Harborne, 1987). Kandungan flavonoid total dapat ditentukan secara kolorimetri dengan reagen AlCl_3 (Chang *et al.*, 2002). Perbandingan baku yang digunakan adalah rutin yaitu glikosida flavonol, rutin sendiri sangat umum ditemukan dalam tumbuhan (Harborne, 1987). Struktur kimia rutin disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Struktur kimia rutin (Markham, 1988).

Kandungan flavonoid total dapat ditentukan secara spektrofometri dengan reagen AlCl_3 dan dinyatakan dalam RE (rutin equivalent) yaitu jumlah kesetaraan

miligram rutin dalam 1 gram sampel (Karadeniz *et al.*, 2005). Prinsip penetapan berdasarkan gugus orto dihidroksi dan gugus hidroksi keton yang membentuk kompleks reagen AlCl_3 sehingga memberikan efek batokromik (Harborne, 1987).

6. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometer UV-Vis merupakan hasil interaksi antara radiasi elektromagnetik (REM) dengan molekul. Pengukuran serapan dengan spektrofotometer UV-Vis dapat dilakukan pada panjang gelombang daerah ultraviolet (190- 380 nm) atau daerah cahaya tampak (380-780 nm) (Harmita, 2006). Prinsip kerjanya adalah interaksi cahaya dan materi yaitu adanya penyerapan ultraviolet atau sinar tampak oleh molekul sehingga terjadi eksitasi elektron pada orbital molekul. Spektrofotometer UV-Vis akan melewatkan sinar pada kuvet (wadah berisi larutan), kemudian akan terbaca panjang gelombang larutan dalam satuan nm. dasar pengukuran absorbansi adalah hukum Lambert-Beer yaitu absorbansi tergantung diameter kuvet (dalam cm), konsentrasi larutan dan koefisien absorpsi molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Roussac, 2004).

Salah satu penggunaan spektrofotometri UV-Vis yaitu untuk menetapkan kadar flavonoid total dari ekstrak daun cengkeh (Wahyuliyarningsih, dkk., 2016).

7. Metode ABTS

Metode ABTS (*2,2-Azinobis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid*) adalah metode pengujian untuk mengukur jumlah radikal yang dapat ditangkal oleh antioksidan yang dikenal dengan kapasitas antioksidan. Cara terbaru yang dikembangkan pada metode ini adalah dengan menambahkan larutan ABTS

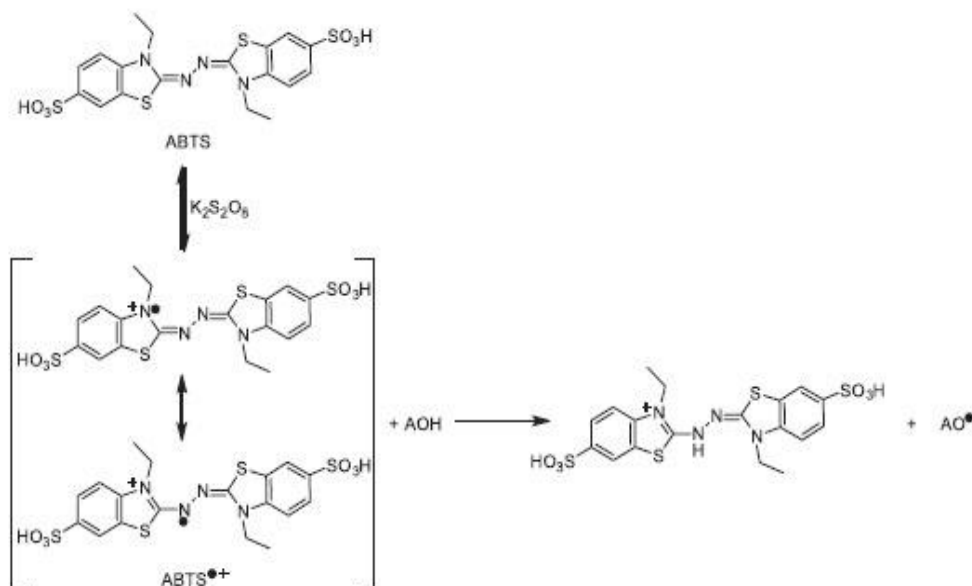
radikal (ABTS[•]) ke dalam antioksidan dan setelah stabil diukur dengan menggunakan spektrofotometer (Ozgen, 2006).

ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang mempunyai karakteristik warna biru-hijau, yang bila tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk non radikal, dari berwarna biru-hijau menjadi tidak berwarna. Secara kimia, reagen ABTS bersifat stabil, larut dalam air dan lipid, serta memiliki kemampuan aktivitas antioksidan secara spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 734 nm (Ozgen, 2006; Yu, 2008).

Metode ABTS memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode lain, yaitu pengujian sederhana, mudah diulang, menggunakan alat yang sederhana dan yang paling penting adalah fleksibel dan dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bersifat hidrophilik maupun lipophilik dalam ekstrak makanan dan cairan (Apak *et al.*, 2007).

Metode ABTS[•] lebih baik dibandingkan dengan metode DPPH[•], karena metode ABTS memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH (Fitriana, 2015). Hal ini disebabkan karena metode ABTS[•] dapat dioperasikan pada range pH yang besar, mudah, murah, berkorelasi terhadap aktivitas antioksidan dalam sistem biologis dan lebih cepat dibandingkan dengan metode DPPH (Arts *et al.*, 2004).

Prinsip uji ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. Radikal kation ABTS^{•+} akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas dan menjadi ABTS yang lebih stabil atau senyawa bukan radikal.



Gambar 3. Oksidasi ABTS oleh kalium persulfat untuk menghasilkan kation radikal $ABTS^{\bullet+}$ dan reaksinya dengan senyawa antiradikal (AOH) (Oliveira, 2006)

F. Landasan Teori

Antioksidan diperlukan oleh manusia untuk mengurangi jumlah radikal bebas dalam tubuh. Salah satu sumber antioksidan alami adalah buah-buahan seperti jeruk nipis. Penelitian Ali dan Abbas (2015), menunjukkan bahwa jeruk nipis mengandung zat bioaktif seperti senyawa flavonoid yang merupakan sumber antioksidan yang sangat baik dan memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Beberapa penelitian menyatakan bahwa flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan flavonoid karena kemampuannya untuk mengurangi pembentukan radikal bebas dan untuk melawan radikal bebas (Ghasemzadeh, 2011; Brunetti *et al.*, 2013).

Aprilano (2013) sudah melakukan penelitian terhadap air perasan jeruk nipis memiliki aktivitas penghambatan terhadap radikal bebas DPPH sebesar $EC_{50} = 6,03\%$ dan penelitian Fajarwati (2013) menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH diperoleh nilai IC_{50}

sebesar 93,41 ppm yang tergolong kuat, dan kulit buah jeruk nipis telah diteliti memiliki aktivitas antioksidan dengan metode yang sama diperoleh nilai IC_{50} sebesar 54,458 $\mu\text{g/mL}$ (Khasanah dkk., 2014). Pengujian ABTS dilakukan karena metode ini memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH (Fitriana dkk., 2015), prosesnya cepat, dapat dilakukan pada rentang pH yang luas serta dapat digunakan pada sistem larutan berbasis air maupun organik (Arnao *et al.*, 1999).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kaur *and* Mondal (2014), menunjukkan bahwa dalam jeruk nipis memiliki kandungan flavonoid yang tinggi dan kandungan flavonoid total pada jeruk nipis mendapatkan hasil sebesar 39,03 mg / 100 g berat segar. Menurut Huang *et al.*, (2005), mekanisme reaksi radikal ABTS dengan antioksidan, dipengaruhi oleh dua komponen yaitu antioksidan dan oksidan. dasar dari reaksi ini adalah reaksi transfer elektron. Oksidan yang memperoleh elektron dari antioksidan akan mengalami perubahan warna biru hijau menjadi bening. Tingkat perubahan warna sebanding dengan konsentrasi antioksidan. Titik akhir reaksi dicapai ketika perubahan warna sudah tidak ada lagi.

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah :

- a. Air perasan jeruk nipis memiliki aktivitas antioksidan.
- b. Air perasan jeruk nipis mengandung senyawa flavonoid.
- c. Air perasan jeruk nipis memiliki kadar flavonoid total tertentu menggunakan metode spektrokolorimetri.