

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Antioksidan atau penangkal radikal bebas beberapa tahun ini cukup populer dikalangan masyarakat, khususnya pada masyarakat yang peduli akan gaya hidup sehat. Masyarakat mulai memperhatikan apa yang dikonsumsi serta memikirkan jenis latihan kebugaran tubuh untuk mencegah penyakit akibat radikal bebas. Beberapa penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung, pembuluh darah dan stroke disebabkan karena stress oksidatif. Stress oksidatif adalah kondisi dimana tidak adanya keseimbangan antara jumlah radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh (Werddhasari, 2014).

Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan tersebut menyebabkan radikal sangat reaktif yang kemudian akan menangkap atau mengambil elektron dari senyawa lain seperti protein, lipid, karbohidrat dan DNA untuk menetralkan diri. Radikal bebas dapat masuk ke dalam tubuh dan menyerang sel-sel yang sehat dan menyebabkan sel-sel tersebut kehilangan fungsi dan strukturnya (Liochev, 2013).

Antioksidan sangat diperlukan oleh tubuh untuk mengatasi stress oksidatif dengan menangkap atau meredam radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Secara alamiah sebenarnya tubuh menghasilkan senyawa antioksidan sebagai pertahanan. Akan tetapi antioksidan yang dihasilkan tubuh tidak mencukupi untuk menangkap semua radikal bebas yang ada sehingga diperlukan tambahan asupan antioksidan dari luar tubuh. Sumber

antioksidan dari luar tubuh dapat didapat secara alami maupun sintetik (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Salah satu sumber antioksidan alami adalah Selada *Romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia). Kandungan kimia tanaman Selada *Romaine* antara lain carotenoid, antosianin dan fenolik (Kim *et al.*, 2016). Jenis Selada Laut (*Ulva Lactuca* L.) dengan kandungan senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, polifenol dan steroid memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 4921,79 ppm (Febriansyah, dkk., 2015). Jenis Selada Air (*Nasturtium Officinale* R.Br) telah dibuktikan mengandung senyawa fenol dan flavonoid serta memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 131,52 ppm (Rahmawati dan Bustanussalam, 2016).

Flavonoid dan fenol merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan (Saxena *et al.*, 2012). Untuk melihat kemampuan antioksidan dari flavonoid digunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri. Parameter yang digunakan untuk pengujian DPPH adalah IC₅₀ yaitu konsentrasi ekstrak yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Flavonoid mampu menangkal radikal *difenilpikrilhidrazil* dengan cara mendonorkan atom hidrogen sehingga berubah menjadi *difenilpikrilhidrazilin* yang bersifat non radikal (Pietta, 2000). Flavonoid merupakan senyawa polar karena memiliki sejumlah gugus hidroksil yang tidak tersubstitusi. Pelarut polar seperti etanol, metanol dan air dapat digunakan untuk menarik senyawa flavonoid namun, pelarut etanol menghasilkan rendemen, kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan tertinggi pada ekstrak daun alpukat dengan rendemen 27,84%,

flavonoid total sebesar 64,12 mgQE/g berat kering bahan dan nilai IC₅₀ sebesar 417 mg/L (Kemit dkk., 2015)

Alkaloid merupakan senyawa polar karena memiliki bentuk garam alkaloid. Hasil isolasi alkaloid pada daun pepaya menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 161,27 ppm (Rachmanto dkk., 2015). Penarikan senyawa aktif dari tanaman selada *romaine* menggunakan pelarut etanol 70% dikarenakan pada ekstrak daun lemon (*Cymbopogon Citratus*) persen aktivitas antioksidan yang diperoleh dari pelarut etanol 70% lebih banyak yaitu 77,65% dibanding dengan etanol 30% sebesar 68,56% dan etanol 96% sebesar 72,47% (Hasim *et al.*, 2015) serta hasil fenol total dan flavonoid total yang didapat dari ekstrak daun betel (*Piper Betle* L.) dengan pelarut etanol 70% lebih besar dibanding etanol 96% (Putri, 2013). Etanol merupakan pelarut yang aman dengan toksisitas lebih rendah dibandingkan dengan metanol (Bimakra dkk., 2010).

Metode penarikan senyawa aktif dari selada *romaine* menggunakan metode *freeze-dried* dengan hasil IC₅₀ 4485,41 ppm (Gan dan Azrina, 2016) menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat lemah. Sehingga, penarikan senyawa aktif pada penelitian ini menggunakan metode maserasi karena sederhana, relatif murah dan terjadinya kontak antara sampel dan pelarut cukup lama sehingga dapat memaksimalkan penarikan senyawa aktif serta menghindari rusaknya komponen senyawa aktif yang tidak tahan panas. Hasil perbandingan metode ekstraksi menggunakan maserasi dan sokletasi menunjukkan hasil yang tidak berbeda jauh yaitu untuk maserasi sebesar 10,92% dan sokletasi 11,56% (Nurhasnawati, 2017). Metode maserasi dapat menghasilkan rendemen ekstrak kayu manis (*Cinnamomum*

burmanii) lebih banyak yaitu 20,54% dibanding sokletasi (8,807%) maupun Infudasi (14,945%) (Wardatun *et al.*, 2017).

Identifikasi senyawa flavonoid, fenol dan alkaloid menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) yang merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Identifikasi senyawa flavonoid, fenol dan alkaloid dari ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) menggunakan metode KLT menunjukkan bahwa sampel ekstrak etanol karika positif mengandung flavonoid, fenol dan alkaloid (Indranila dan Ulfah, 2015). Berdasarkan beberapa hal tersebut maka, dilakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antioksidan Selada *Romaine* beserta identifikasi senyawa kimianya.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang masalah, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak etanol selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) memiliki aktivitas antioksidan?
2. Apakah jenis senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) ?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia).

2. Mengetahui kandungan senyawa kimia dalam ekstrak etanol selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia).

D. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat yaitu:

1. Memberikan informasi ilmiah mengenai Selada *Romaine* terhadap efek antioksidan yang dimiliki.
2. Meningkatkan kegunaan ekstrak Selada *Romaine* sebagai bahan obat alami terutama sebagai sumber antioksidan dalam upaya meningkatkan pendayagunaan kekayaan sumber alam Indonesia.

E. Tinjauan pustaka

1. Selada *Romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia)

a. Klasifikasi

Kedudukan Selada *Romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) dalam sistematika tanaman (taksonomi) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Sub Kingdom : Tracheobionta
 Super Divisi : Spermatophyta
 Divisi : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Ordo : Asterales
 Famili : Asteraceae
 Genus : *Lactuca*

Spesies : *Lactuca Sativa* L.

Varietas : *Lactuca Sativa* var. Longifolia (Rukmana, 2005)

b. Morfologi

Selada termasuk tanaman semusim yang banyak mengandung air (*herbaceous*). Batangnya pendek berbuku–buku sebagai tempat kedudukan daun. Daun–daun selada berbentuk bulat panjang, yang mana panjangnya ± 25 cm dan lebar ± 15 cm. Sistem perakaran tanaman selada adalah akar tunggang dan cabang–cabang akarnya menyebar ke semua arah pada kedalaman 25–50 cm. Di daerah yang beriklim sedang (sub tropis) (Rukmana, 2005).

Selada *Romaine* (Selada *cos*) ini mempunyai krop yang lonjong. Daunnya lebih tegak bila dibandingkan daun selada yang umumnya menjuntai ke bawah. Ukurannya besar dan warnanya hijau tua serta agak gelap. Meskipun sedikit liat, selada jenis ini rasanya enak. Jenis selada ini tergolong lambat pertumbuhannya (Prawoto, 2012). Tanaman selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) dapat dilihat pada Gambar 1:



Gambar 1. Tanaman Selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) (Prawoto, 2012)

c. Kandungan Kimia

Kandungan kimia Selada *Romaine* antara lain carotenoid, antosianin, fenolik (Kim *et al.*, 2016). Selain itu juga mengandung serat, provitamin A, kalium dan kalsium (Supriati dan Herlina, 2014). Kandungan gizi per 100 g Selada yaitu kalori 15 kal, protein 1,2 gr, lemak 0,2 gr, karbohidrat 2,9 gr, kalsium 22 mg, fosfor 25 mg, zat besi 0,5 mg, vitamin A 450 S.I, vitamin B1 0,04 mg, vitamin C 8 mg dan air 94,8 gr (Rukmana, 2005).

d. Manfaat Tanaman

Selada *Romaine* memiliki banyak manfaat antara lain dapat memperbaiki organ dalam, melancarkan metabolisme, membantu menjaga kesehatan rambut, mencegah kulit menjadi kering dan dapat mengobati insomnia (Supriati dan Herlina, 2014). Flavonoid dan polifenol merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan (Winarsi, 2007). Selada romaine juga mengandung serat (Kim *et al.*, 2016) yang merupakan substansi yang dapat memperbaiki flora usus melalui pertumbuhan bakteri *Lactobacillus* (Kusharto, 2006).

2. Radikal bebas

Radikal bebas adalah sekelompok bahan kimia baik berupa atom maupun molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan pada lapisan luarnya atau kehilangan elektron, sehingga apabila dua radikal bebas bertemu, mereka bisa memakai bersama elektron tidak berpasangan membentuk ikatan kovalen. Molekul biologi pada dasarnya tidak ada yang bersifat radikal. Apabila molekul non radikal bertemu dengan radikal bebas, maka akan terbentuk suatu molekul radikal yang baru. Dapat dikatakan, radikal bebas bersifat tidak stabil dan selalu berusaha

mengambil elektron dari molekul di sekitarnya, sehingga radikal bebas bersifat toksik terhadap molekul biologi/sel. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, produksi prostaglandin dan protein lain seperti enzim yang terdapat dalam tubuh.

Radikal bebas yang mengambil elektron dari DNA dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbullah sel-sel mutan. Bila mutasi ini terjadi berlangsung lama dapat menjadi kanker. Radikal bebas juga berperan dalam proses menua, dimana reaksi inisiasi radikal bebas di mitokondria menyebabkan diproduksinya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang bersifat reaktif. Radikal bebas dapat dihasilkan dari hasil metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultra violet, zat kimiawi dalam makanan dan polutan lain (Werdhasari, 2014).

3. Antioksidan

Antioksidan adalah substansi yang dapat menetralkan radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Antioksidan mampu menetralkan radikal bebas karena senyawa ini memiliki struktur molekul yang dapat memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa terganggu sama sekali fungsinya dan dapat memutus reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stress oksidatif (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Antioksidan digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi (Suryanto, 2012). Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen, yaitu enzim-enzim

yang bersifat antioksidan, seperti: *Superoksida Dismutase (SOD)*, katalase (Cat), dan glutathione peroksidase (Gpx); serta antioksidan eksogen, yaitu yang didapat dari luar tubuh/makanan. Berbagai bahan alam asli Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktifnya, antara lain vitamin C, E, pro vitamin A, organosulfur, *a-tocopherol*, *flavonoid*, *thymoquinone*, statin, niasin, *phycocyanin* dan lain-lain. Berbagai bahan alam, baik yang sudah lama digunakan sebagai makanan sehari-hari atau baru dikembangkan sebagai suplemen makanan, mengandung berbagai antioksidan tersebut (Werdhasari, 2014).

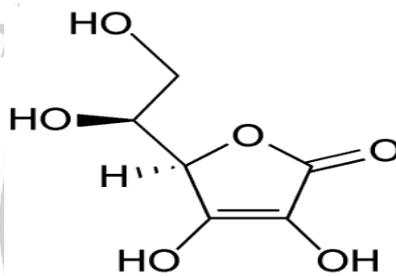
4. Vitamin C

Vitamin C adalah vitamin yang larut di dalam air dan sangat banyak dijumpai pada tanaman sebagai L-asam askorbat. 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 *et al.*, 1996).

Vitamin C merupakan sumber antioksidan primer yang berperan menghentikan reaksi rantai dengan berfungsi sebagai donor elektron pada radikal bebas sehingga berdampak terhadap pembentukan produk yang lebih stabil. Antioksidan primer ini mampu bereaksi memutuskan radikal bebas pada tahap inisiasi atau menghambat reaksi propagasi dengan cara bereaksi dengan radikal peroksil atau alkoksida (Madhavi & Salunkhe, 1996). Vitamin C juga berperan sebagai antioksidan sekunder yang berfungsi menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai dengan cara mengikat atau mengkelat ion

logam, sebagai penangkal oksigen, mengubah hidroperoksida menjadi molekul non-radikal (Pokorny *et al.*, 2001).

Vitamin C memiliki peranan penting dalam tubuh manusia. Namun, mengkonsumsi vitamin C berlebih tidak baik untuk kesehatan. Kelebihan vitamin C dapat menyebabkan terbentuknya batu ginjal dan diare. Kebutuhan vitamin C berbeda-beda, konsumsi vitamin C yang dibutuhkan oleh manusia rata-rata 60 mg per hari (Hernani dan Rahardjo, 2006). Struktur kimia Vitamin C dapat dilihat pada Gambar 2 :



Gambar 2. Struktur Kimia Vitamin C (Depkes, 1995)

5. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Depkes, 2000). Bahan yang akan diekstrak biasanya berupa bahan kering yang telah dihancurkan, biasanya berbentuk bubuk atau simplisia. Kehalusan berpengaruh terhadap rendemen ekstrak pada simplisia temulawak, pada ukuran 40 mesh menunjukkan rendemen ekstrak sebesar 30,69% sedangkan 60 mesh sebesar 32,49% (Sembiring dkk., 2006). Simplisia merupakan

bahan alamiah yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan dan kecuali dikatakan lain berupa bahan yang telah dikeringkan (Depkes, 2000).

Proses pengekstraksian komponen kimia dalam sel tanaman yaitu pelarut organik akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dalam pelarut organik di luar sel, maka larutan terpekat akan berdifusi keluar sel dan proses ini akan berulang terus sampai terjadi keseimbangan antara konsentrasi cairan zat aktif di dalam dan di luar sel. Ekstraksi bertujuan untuk mendapatkan komponen-komponen bioaktif suatu bahan (Harborne, 1987).

Metode ekstraksi biasanya dipilih berdasarkan sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi serta kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau bahkan mendekati sempurna dari bahan obat (Ansel, 1989). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi adalah ekstraksi menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Secara teknologi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Ferdiansyah, 2006). Perendaman sampel tumbuhan akan terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama. Terdistribusinya pelarut organik yang terus menerus ke dalam sel tumbuhan mengakibatkan perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Sehingga, pemecahan dinding, membran sel dan metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut. Hal ini akan membuat ekstraksi menjadi sempurna karena lamanya perendaman yang dilakukan. Lamanya waktu maserasi akan mempengaruhi jumlah rendemen ekstrak pada kulit

durian yang menunjukkan bahwa semakin lama waktu ekstraksi, hasil ekstrak yang didapatkan semakin banyak sampai dengan waktu tertentu yaitu 9 hari sebesar 26,71% dan mengalami penurunan rendemen pada hari ke 11 yaitu 22,31% (Ningsih dkk., 2015)

Kelebihan dari metode maserasi yaitu sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan yang rumit, terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Kekurangan dari metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama, butuh pelarut dalam jumlah banyak dan tidak bisa untuk bahan-bahan yang memiliki tekstur keras.

Ekstrak yang didapat dari maserasi perlu dipisahkan dari pelarutnya dengan pemanasan dipercepat oleh putaran pada labu alas bulat dengan *rotary evaporator*, dengan bantuan pompa vakum, uap penyari akan menguap naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi molekul-molekul cairan pelarut murni yang akan ditampung dalam labu alat bulat penampung. Larutan penyari dapat menguap karena adanya penurunan tekanan (Sudjadi, 2007).

Perbandingan metode ekstraksi antara maserasi, sokletasi dan infundasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% untuk maserasi dan sokletasi serta pelarut air untuk infundasi pada ekstrak kayu manis (*Cinnamomum burmani*) menunjukkan bahwa hasil rendemen ekstrak terbanyak adalah metode maserasi. Metode maserasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 20,54% sedangkan sokletasi sebesar 8,807% dan infundasi sebesar 14,945% (Wardatun *et al.*, 2017). Perbandingan metode ekstraksi antara maserasi dan sokletasi juga dilakukan pada ekstrak etanol

daun jambu bol (*syzygium malaccense* L.) dengan menggunakan pelarut etanol 70%. Hasil rendemen ekstrak yang diperoleh tidak berbeda terlalu jauh, untuk metode maserasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 10,92% dan metode sokletasi menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 11,56% (Nurhasnawati, 2017).

6. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah suatu metode analisis yang didasarkan pada pengukuran serapan monokromatis oleh larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor fototube. Spektrofotometer adalah instrumen yang digunakan untuk mengukur transmittan atau absorbansi suatu sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrofotometer terdiri dari spektrometer dan fotometer. Spektrometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Khopkar, 1990).

Teknik yang biasa digunakan dalam analisis meliputi spektrofotometer ultraviolet, infra merah dan cahaya tampak (visibel). Panjang gelombang spektrofotometer ultraviolet adalah 190-350 nm dan cahaya tampak atau visibel adalah 350-780 nm. Gugus fungsi yang menyerap radiasi di daerah ultraviolet dan cahaya tampak (visibel) disebut gugus kromofor (Lestari, 2007).

Prinsip kerja spektrofotometer adalah bila cahaya (monokromatik maupun campuran) jatuh pada suatu medium homogen, sebagian dari sinar masuk akan dipantulkan, sebagian diserap dalam medium itu dan sisanya diteruskan. Nilai yang keluar dari cahaya yang diteruskan dinyatakan dalam nilai absorbansi karena

memiliki hubungan dengan konsentrasi sampel. Besarnya serapan (absorbansi) sebanding dengan besarnya konsentrasi (c) larutan uji. Pernyataan ini dikenal dengan Hukum Lambert Beer (Rohman, 2007) :

$$A = a \cdot b \cdot c \text{ atau } A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Dimana:

A = absorban

b = tebal laju larutan

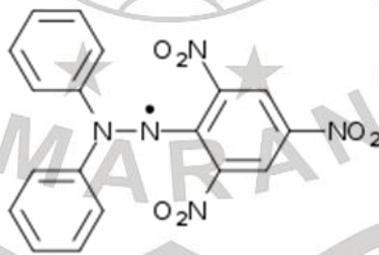
ϵ = tetapan absorbtivitas molar

a = absorbisity molar

c = konsentrasi

7. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

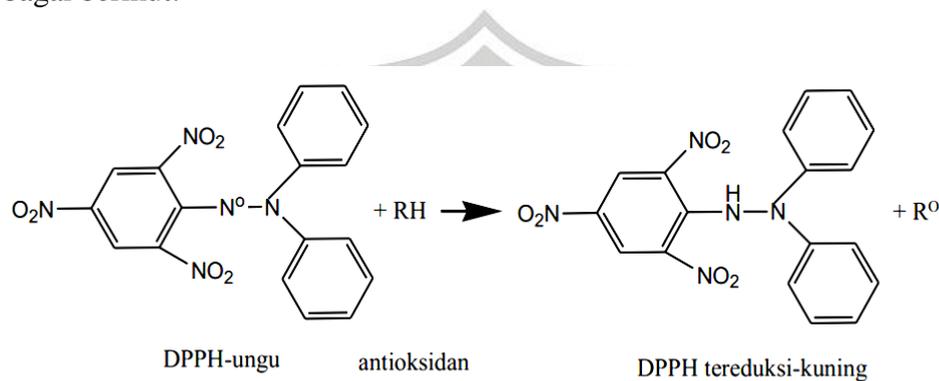
Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil) merupakan metode paling umum yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) merupakan suatu radikal stabil berwarna ungu dan larut dalam etanol maupun metanol yang dapat diukur intensitas warnanya pada panjang gelombang 515-520 nm (Molyneux, 2004). Struktur kimia DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dapat dilihat pada Gambar 3 berikut ini :



Gambar 3. Struktur Kimia DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) (Molyneux, 2004)

Prinsip reaksi dari metode ini adalah penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH. Mekanisme yang terjadi adalah reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH (warna ungu) dan diubah menjadi 2,2-difenil-1-pikrihidrazin (warna kuning). Pemudaran warna akan

mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer. Semakin pudarnya warna DPPH setelah direaksikan dengan antioksidan menunjukkan kapasitas antioksidan yang semakin besar pula (Yanuwar, 2002). Reaksi radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 5 sebagai berikut:



Gambar 4. Reaksi Radikal Bebas DPPH dengan Senyawa Antioksidan (Rohmatussolihat, 2009)

8. *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀)

Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀ atau *Inhibitor Concentration*₅₀ yang merupakan konsentrasi dari larutan sampel yang terindikasi berpotensi antioksidan yang dapat meredam atau menghambat 50% radikal bebas (DPPH). Harga IC₅₀ berbanding terbalik dengan kemampuan zat atau senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Semakin kecil nilai IC₅₀, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu bahan (Molyneux, 2004). Klasifikasi aktivitas antioksidan menurut Blois (1958) dapat dilihat pada tabel I sebagai berikut:

Tabel I. Klasifikasi Aktivitas Antioksidan (Blois, 1958)

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

9. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode pemisahan suatu senyawa berdasarkan perbedaan distribusi dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dapat digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) analitik digunakan untuk menganalisis senyawa-senyawa organik dalam jumlah kecil misalnya, menentukan jumlah komponen dalam campuran dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif. Sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya, yang selanjutnya fraksi-fraksi tersebut dikumpulkan dan digunakan untuk analisa berikutnya (Sastrohamidjojo, 2005).

Fase diam dalam KLT berupa silika gel yang mampu mengikat senyawa yang akan dipisahkan. Sedangkan fase geraknya berupa berbagai macam pelarut atau campuran pelarut. Proses pengembangan atau elusi ialah proses pemisahan campuran cuplikan akibat pelarut pengembang merambat naik dalam lapisan fase diam. Jarak hasil pemisahan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan harga R_f (Sastrohamidjojo, 2005). Harga R_f dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak senyawa yang terelusi}}{\text{jarak pelarut yang mengelusi}}$$

F. Landasan Teori

Radikal bebas berperan dalam penyebab terjadinya penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung dan stroke (Sen *et al.*, 2010). Antioksidan diperlukan oleh tubuh untuk mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Salah satu sumber antioksidan alami adalah selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia). Kandungan kimia selada *romaine* antara lain carotenoid, antosianin dan fenolik (Kim *et al.*, 2016).

Flavonoid dan fenol merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan (Saxena *et al.*, 2012). Aktivitas antioksidan flavonoid bersumber pada kemampuan mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha, 2010). Alkaloid juga berpotensi sebagai antioksidan dengan mekanisme mengkelat logam (Tiong *et al.* 2013). Aktivitas antioksidan selada *romaine* menggunakan metode ekstraksi *freeze-dried* menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 4485,41 ppm serta positif mengandung senyawa flavonoid dan fenolik (Gan dan Azrina, 2016).

G. Hipotesis

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah

1. Adanya aktivitas antioksidan ekstrak etanol selada *romaine* (*Lactuca Sativa* Var. Longifolia) dengan metode DPPH.
2. Adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid dan senyawa fenolik pada ekstrak etanol selada *romaine*.