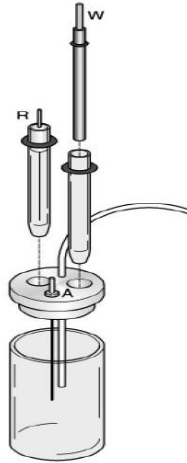


II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Voltammetri

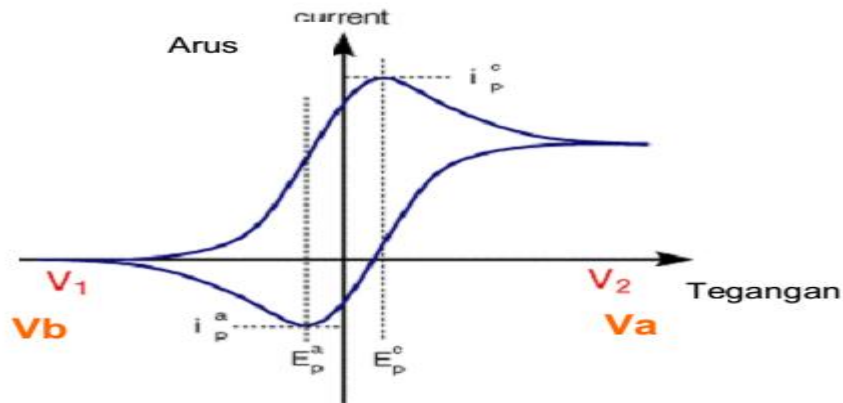
Voltametri merupakan salah satu teknik elektroanalitik dengan prinsip dasar elektrolisis. Elektroanalisis merupakan suatu teknik yang berfokus pada hubungan antara besaran listrik dengan reaksi kimia, yaitu menentukan satuan-satuan listrik seperti arus, potensial, atau tegangan, dan hubungannya dengan parameter-parameter kimia (Balazs *et al.*, 1999).

Dalam teknik voltammetri, potensial yang diberikan dapat diatur sesuai keperluan. Kelebihan dari teknik ini adalah sensitifitasnya yang tinggi, limit deteksi yang rendah dan memiliki daerah linier yang lebar. Selama proses pengukuran, konsentrasi analit praktis tidak berubah karena hanya sebagian kecil analit yang dielektrolisis. Potensial elektroda kerja diubah selama pengukuran, dan arus yang dihasilkan dialurkan terhadap potensial yang diberikan pada elektroda kerja. Arus yang diukur pada analisis voltammetri terjadi akibat adanya reaksi redoks pada permukaan elektroda. Kurva arus terhadap potensial yang dihasilkan disebut dengan voltammogram (Burns *et al.*, 1981). Arus yang dihasilkan sebanding dengan konsentrasi analit dalam larutan. Adapun sel voltammetri dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Sel Voltammetri, W: Elektroda kerja, R : Elektroda pembanding, A : Elektroda bantu (Monk, 2001).

Sel voltammetri (Gambar 1) terdiri dari tiga elektroda, yaitu elektroda kerja, elektroda pembanding, dan elektroda bantu. Metode voltammetri atau polarography atau *polarographic analysis* merupakan metode elektroanalisis dimana informasi tentang analit diperoleh dari pengukuran arus fungsi potensial. Teknik pengukurannya dilakukan dengan cara mempolarisasikan elektroda kerja. Metode ini termasuk metode aktif karena pengukurannya berdasarkan potensial yang terkontrol (Skoog *et al.*, 1996). Kurva voltammogram ditunjukkan pada Gambar 2, yang merupakan pengukuran menggunakan metode voltammetri siklik, memerlukan suatu instrumen pengukuran yang tepat. Instrumen yang digunakan pada pengukuran ini dinamakan potensiostat (Samuel, 1998).



Gambar 2. Kurva voltamogram dari elektrode kimia reversibel, memiliki puncak arus katoda dan puncak arus anoda.

Pada kurva voltammogram siklik Gambar 2, memiliki puncak arus katoda I_{pa} dan puncak arus anoda I_{pc} .

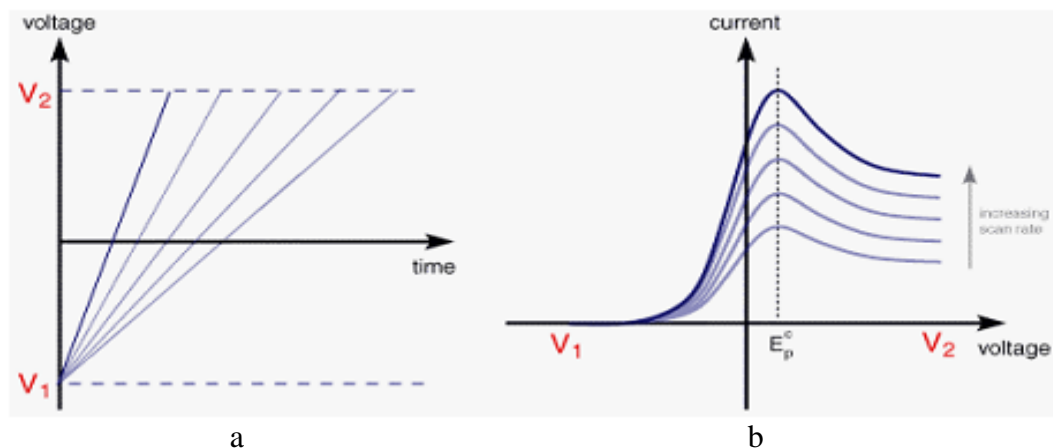
B. *Linear Sweep Voltammetry (LSV)*

Linear sweep voltammetry adalah istilah umum untuk suatu teknik voltametri dimana potensial yang diberikan pada elektroda kerja dengan variasi waktu linier. Metode ini juga mencakup polarografi, siklik voltametri, dan voltametri disk rotasi. Slope yang dihasilkan dari metode ini memiliki unit potensial (volt) per satuan waktu, dan biasanya disebut laju selusur percobaan.

Nilai dari laju selusur percobaan dapat divariasikan dari tingkat rendah mV/sec (khusus untuk polarografi) sampai tingkat tinggi 1.000.000 V/sec (tercapai bila digunakan ultra mikroelektroda sebagai elektroda kerja). Dalam voltametri pemindaian linier (*linear sweep voltammetry, LSV*), pemindaian dilakukan dari batas potensial yang lebih rendah menuju yang lebih tinggi. Karakteristik *LSV*

tergantung pada laju reaksi transfer elektron, reaktivitas kimia dari spesi-spesi elektroaktif dan laju pemindaian potensial (Wang, 2001).

Pada LSV, potensial dari indikator elektroda bervariasi secara linear sebagai fungsi dari waktu. Tingkat scan yaitu 100 mV/s, yang memungkinkan waktu bagi analit untuk sampai ke elektroda sehingga elektroda selalu dalam kesetimbangan dengan larutan induk. LSV memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif. Nilai $E_{1/2}$ dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies yang tidak diketahui, sedangkan ketinggian dari arus dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi. Voltammogram *linear sweep* terdapat dalam Gambar 3 yang tercatat pada tingkat pemindaian tunggal.



Gambar 3. Peningkatan linear potensial vs waktu (Andrienko, 2008).

Gambar 3a menunjukkan laju selusur tunggal pada voltametri *linear sweep* dan Gambar 3b menunjukkan voltammogram dengan teknik *linear sweep*.

Karakteristik voltammogram *linear sweep* tergantung pada 3 faktor, yaitu:

1. Laju reaksi transfer elektron (s)
2. Reaktivitas kimia dari spesi elektroaktif

3. Laju selusur tegangan

Dalam pengukuran LSV, respon arus diplotkan sebagai fungsi tegangan daripada waktu, tidak seperti tahap pengukuran potensial. Pemindaian dimulai dari sisi kiri arus / plot tegangan di mana belum adanya arus yang mengalir. Sepanjang jendela potensial, pemindaian lebih lanjut ke arah kanan (ke nilai yang lebih reduktif) dan arus mulai mengalir kemudian mencapai puncaknya. Untuk memberi alasan perilaku ini, perlu dipertimbangkan pengaruh tegangan pada tetapan keseimbangan di permukaan elektroda. Laju transfer elektron dinilai cepat dalam perbandingan dengan laju pemindaian tegangan. Oleh karena itu, tetapan kesetimbangan pada sebuah permukaan elektroda identik dengan prediksi termodinamika.

C. Validasi Metode

Validasi metode adalah sebuah proses yang penting dari program jaminan mutu hasil uji dimana sifat-sifat dari sebuah metode ditentukan dan dievaluasi secara obyektif (Garfield *et al.*, 2000). Hasil dari validasi metode dapat digunakan untuk menilai kualitas, tingkat kepercayaan (reliability), dan konsistensi hasil analisis, itu semua menjadi bagian dari praktek analisis yang baik (Huber, 2001).

Pemilihan parameter validasi tergantung pada beberapa faktor seperti aplikasi, sampel uji, tujuan metode, dan peraturan lokal atau internasional. Parameter-parameter validasi meliputi ketepatan/akurasi, ketelitian, spesifisitas, limit deteksi, limit kuantisasi, linearitas, rentang, *robustness*, dan *ruggedness* (ICH, 1996).

1. Ketepatan (*accuracy*)

Akurasi atau ketepatan adalah ukuran yang menunjukkan derajat kedekatan hasil analisis dengan kadar analit yang sebenarnya. Ketepatan dapat juga menyatakan kedekatan dengan nilai yang dapat diterima, baik nilai sebenarnya maupun nilai pembanding. Nilai benar dalam akurasi dapat diperoleh dengan beberapa cara. Salah satu alternatifnya adalah membandingkan hasil metode dengan hasil dari metode referensi yang sudah ditetapkan. Pendekatan ini mengasumsikan bahwa ketidakpastian metode referensi diketahui. Kedua, akurasi dapat dinilai dengan menganalisis sampel yang sudah diketahui konsentrasi (CRM) dan membandingkan nilai diukur dengan nilai sebenarnya sebagai disertakan dengan materi. Akurasi dapat ditentukan dengan nilai benar dari referensi material (μ), rata-rata terukur referensi material (x_t), nilai tabel t dengan tingkat kepercayaan yang diinginkan, simpangan baku (SD), jumlah pengulangan (n) dan dinyatakan dalam persamaan 1 :

$$\mu - x_t = \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}} \dots \dots \dots (1)$$

Jika $\mu - x_t > \pm \frac{t \times SD}{\sqrt{n}}$, maka ada bias terbukti. Begitu sebaliknya maka tidak

ada bias hasil pengukuran (Nurhadi, 2012).

2. Kecermatan (*precision*)

Presisi prosedur analitis menggambarkan kedekatan kesepakatan (derajat penyebaran) antara serangkaian pengukuran yang diperoleh dari beberapa pengambilan sampel homogen yang sama di bawah kondisi yang ditentukan.

Presisi dapat dipertimbangkan pada tiga tingkatan, yaitu: pengulangan, presisi intermediate dan reproduksibilitas. Simpangan baku, simpangan baku relatif (koefisien variasi) dan interval kepercayaan harus dilaporkan untuk penentuan nilai presisi (EMEA, 1995).

Dalam mengevaluasi ketelitian dari data analisis adalah dengan menghitung simpangan baku. Simpangan baku mengukur penyebaran data-data percobaan dan memberikan indikasi yang bagus mengenai seberapa dekat data tersebut satu sama lain (Nielsen, 2003). Simpangan baku diperoleh dari akar pembagian hasil penjumlahan kuadrat dengan derajat bebas (n-1) dan dinyatakan pada persamaan 2 :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (xi - \bar{x})^2}{n-1}} \dots\dots\dots (2)$$

Cara lain untuk mengukur ketelitian adalah dengan menghitung nilai simpangan baku relatif (RSD). Nilai RSD ini merupakan nilai simpangan baku (SD) yang ditentukan sebagai persentase dari rata-rata (\bar{x}) dan dinyatakan dalam persamaan 3:

$$\%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (3)$$

3. Linieritas

Linearitas merupakan kemampuan metode analisis (dalam kisaran tertentu) untuk mendapatkan hasil uji yang berbanding lurus dengan konsentrasi dari analit dalam sampel. Nilai koefisien regresi yang memenuhi persyaratan adalah $(R) \geq 0,99$

(EMEA, 1995). Respons harus berbanding lurus dengan konsentrasi analit atau proporsional dengan cara perhitungan matematis yang terdefinisi dengan baik. Persamaan regresi linier diterapkan pada hasil harus memiliki nilai *intercept* tidak signifikan berbeda dari nol. Jika diperoleh intersep tidak signifikan nol, harus dibuktikan bahwa ini tidak berpengaruh pada keakuratan metode (Huber, 2001).

4. Batas Deteksi (*Limit Of Detection*)

Batas deteksi (*Limit Of Detection*) merupakan jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat dideteksi tetapi tidak harus kuantitatif sebagai nilai yang pasti. Batas kuantifikasi prosedur analitis individu adalah jumlah terendah analit dalam sampel yang dapat ditentukan secara kuantitatif dengan presisi dan akurasi yang cocok. Batas kuantifikasi merupakan parameter tes kuantitatif untuk tingkat rendah senyawa dalam matriks sampel, dan digunakan terutama untuk penentuan kotoran dan produk terdegradasi (EMEA, 1995). Batas deteksi dapat ditentukan melalui pengukuran larutan tanpa sampel uji atau pengukuran sampel uji dengan konsentrasi terendah (Eurachem, 2014). Batas deteksi ditentukan dengan perhitungan standar deviasi (SD) kemudian dikalikan 3 dan dinyatakan dalam persamaan 4 :

$$3 \times SD \dots\dots\dots(4)$$

D. Mikroalga

a. Morfologi dan Klasifikasinya

Mikroalga adalah organisme tumbuhan paling primitif berukuran seluler yang umumnya dikenal dengan sebutan nama fitoplankton. Habitat hidupnya adalah wilayah perairan di seluruh dunia. Habitat hidup mikroalga adalah di perairan atau tempat-tempat lembab. Organisme ini merupakan produsen primer perairan yang mampu berfotosintesis seperti layaknya tumbuhan tingkat tinggi lainnya.

Mikroalga yang hidup di laut dikenal dengan istilah *marine microalgae* atau mikroalga laut. Mikroalga yang banyak ditemukan berasal dari kelas *Bacillariophyceae* (diatom), *Chrysophyceae* (alga coklat keemasan), *Chlorophyceae* (alga hijau), dan kelas *Cyanophyceae* (*blue green algae*/alga biru-hijau). Berdasarkan pigmen yang dimiliki mikroalga dikelompokkan menjadi lima filum, yaitu :

1. *Chlorophyta* (alga hijau)
2. *Chrysophyta* (alga keemasan)
3. *Pyrrhopyta* (alga api)
4. *Euglenophyta*
5. *Cyanophyta* (alga biru-hijau) (Kawaroe *et al.*, 2010).

b. Kondisi Lingkungan yang Mempengaruhi Pertumbuhan Mikroalga

Komunitas mikroalga pada suatu perairan dipengaruhi oleh kondisi lingkungan perairan tersebut. Kondisi lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan

mikroalga antara lain temperatur, kualitas dan kuantitas nutrien (unsur hara), intensitas cahaya, derajat keasaman (pH), aerasi (sumber CO₂), dan salinitas.

1. Temperatur

Temperatur optimal untuk kultivasi mikroalga antara 24-30°C, dan bisa berbeda-beda bergantung lokasi, komposisi media yang digunakan serta jenis mikroalga yang dikultivasi. Namun sebagian besar mikroalga dapat mentoleransi temperatur antara 16-35°C. Temperatur di bawah 16°C dapat memperlambat pertumbuhan dan temperatur diatas 35°C dapat menimbulkan kematian pada beberapa spesies mikroalga. Sedangkan menurut Reynolds (1990), temperatur optimal bagi pertumbuhan mikroalga adalah 25-40°C. Temperatur perairan di Indonesia sangat mendukung pertumbuhan mikroalga yang dikultivasi pada kolam-kolam budidaya.

2. Nutrien (Unsur Hara)

Unsur hara yang dibutuhkan mikroalga terdiri dari mikronutrien dan makronutrien. Makronutrien antara lain C, H, N, P, K, S, Mg dan Ca. Sedangkan mikronutrien yang dibutuhkan antara lain adalah Fe, Cu, Mn, Zn, Co, Bo, Vn, dan Si. Di antara nutrien tersebut, N dan P sering menjadi faktor pembatas pertumbuhan mikroalga.

Konsentrasi mikroalga yang dikultivasi secara umum lebih tinggi daripada yang di alam, sehingga diperlukan penambahyangan nutrien untuk mencukupi kekurangan pada media kultivasi. Dalam kultivasi mikroalga ditambahkan nutrien antara lain

Nitrat, Pospat, dan Silikat untuk memenuhi nutrien pada air laut (Lavens dan Sorgeloos, 1996). Nutrien yang diberikan kepada mikroalga bergantung jenis mikroalga dan kebutuhannya.

3. Intensitas Cahaya

Sama seperti layaknya semua tumbuhan, mikroalga juga melakukan proses fotosintesis, yaitu mengasimilasi karbon anorganik untuk dikonversi menjadi materi organik. Bersama dengan cahaya sebagai sumber energi yang sangat berperan dalam proses fotosintesis pada alga. Oleh karena itu, intensitas cahaya memegang peranan yang sangat penting, namun intensitas cahaya yang diperlukan tiap-tiap alga untuk dapat tumbuh secara maksimum berbeda-beda.

Intensitas cahaya yang diperlukan bergantung volume kultivasi dan densitas mikroalga. Makin tinggi densitas dan volume intensitas cahaya yang diperlukan untuk kultivasi pada erlenmeyer adalah 1.000 lux, sedangkan untuk volume kultivasi yang lebih besar diperlukan intensitas cahaya 5.000-10.000 lux (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

Sinar matahari di Indonesia mencukupi untuk kebutuhan kultivasi mikroalga. Dengan kedalaman kolam 1 meter masih memungkinkan sinar matahari mencapai dasar perairan. Bandingkan dengan kultivasi di negara-negara 4 musim, seperti Eropa yang memiliki kedalaman kolam maksimal hanya 60 cm karena keterbatasan intensitas dan foto periode sinar matahari.

4. Aerasi

Aerasi dibutuhkan untuk mencegah terjadinya sedimentasi pada sistem kultivasi mikroalga, selain itu juga untuk memastikan bahwa semua sel mikroalga mendapat cahaya dan nutrisi yang sama dimanapun berada, untuk menghindari stratifikasi suhu dan tercampurnya air dengan suhu berbeda, terutama pada kultivasi di luar laboratorium, dan untuk meningkatkan pertukaran cahaya antara medium kultivasi dan udara. Udara merupakan sumber karbon untuk fotosintesis dalam bentuk karbon dioksida (CO_2). Untuk kultivasi yang sangat padat, CO_2 yang berasal dari udara (0,003% CO_2) tidak mencukupi bagi pertumbuhan optimal mikroalga, sehingga perlu ditambahkan dengan CO_2 murni (rata-rata 1% dari volume udara). Penambahan CO_2 selanjutnya menjadi buffer pH sebagai hasil dari kesetimbangan gas karbon dioksida (CO_2) dan asam karbonat (HCO_3). Gas CO_2 yang masuk ke perairan akan berubah bentuk menjadi asam karbonat (HCO_3) bergantung dari derajat keasaman (pH) air. Derajat keasaman yang optimum dapat melarutkan CO_2 adalah pada kisaran 6,5-9,5. Jika pH di bawah kisaran tersebut, maka karbon dioksida tetap berbentuk CO_2 , artinya gas CO_2 dapat cepat lepas ke atmosfer, sehingga tidak terserap oleh mikroalga. Sebaliknya, apabila kondisi pH di atas kisaran tersebut, maka CO_2 menjadi bikarbonat yang tidak dapat diserap oleh mikroalga. Perlu diperhatikan, bahwa tidak semua alga dapat mentoleransi aerasi yang kuat karena proses pengadukan yang terlalu kencang dapat mengakibatkan rusaknya sel mikroalga, sehingga menjadi mati.

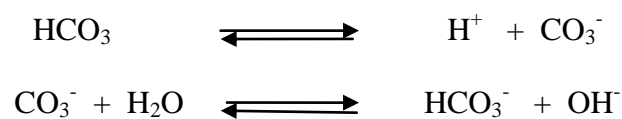
5. Salinitas

Salinitas air adalah salah satu faktor yang berpengaruh terhadap organisme air dalam mempertahankan tekanan osmotik yang baik antara protoplasma organisme dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Mikroalga laut mempunyai toleransi yang besar terhadap perubahan salinitas. Salinitas 20-24‰ merupakan salinitas yang optimal (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

6. Derajat Keasaman (pH)

Proses fotosintesis merupakan proses penyerapan karbon dioksida yang terlarut di dalam air, dan berakibat penurunan CO_2 terlarut dalam air. Penurunan ini akan meningkatkan pH. Oleh karena itu, laju fotosintesis akan terbatas oleh penurunan karbon, dalam hal ini adalah ketersediaan karbon dioksida (CO_2), perubahan bentuk karbon yang ada di perairan dan tingginya nilai pH (Talling, 1976 dalam Reynolds, 1990).

Menurut Boyd (1990), kesetimbangan karbonat akan bertindak sebagai buffer pH. Dalam keadaan basa, ion bikarbonat akan membentuk ion karbonat dan melepaskan ion hidrogen yang bersifat asam, sehingga menjadi netral. Sebaliknya, dalam keadaan terlalu asam, ion karbonat akan mengalami hidrolisis bersifat basa, sehingga keadaan kembali menjadi netral. Reaksi tersebut dapat dilihat pada persamaan berikut :



Rata-rata pH untuk kultivasi sebagian besar spesies mikroalga adalah pH 7 sampai pH 9, dengan pH optimum berkisar antara pH 8,2 sampai pH 8,7 (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

c. Sterilisasi

Sterilisasi merupakan proses yang ditujukan untuk membersihkan alat serta bahan yang akan digunakan untuk isolasi maupun kultivasi mikroalga dari mikroorganisme serta bahan kimia yang dapat menjadi kontaminan. Proses ini meliputi sterilisasi wadah baru, wadah habis pakai dan sterilisasi pipet setelah digunakan. Metode yang digunakan untuk sterilisasi alat maupun bahan yang digunakan untuk isolasi serta kultivasi mikroalga adalah :

1. Autoclave

Autoclave adalah cara populer dan paling efektif untuk mensterilkan bahan-bahan tahan panas dan biasanya digunakan untuk mensterilkan cairan. Tekanan uap yang tinggi di dalamnya menghasilkan temperatur yang tinggi untuk sterilisasi ($\pm 121^{\circ}\text{C}$) tanpa mendidihkan cairan. Lama autoclave bergantung volume cairan yang ingin disterilisasikan. Autoclave selama 10 menit pada suhu 12°C cukup untuk mensterilkan tabung reaksi dengan diameter 18 mm, sedangkan waktu 1 jam dibutuhkan untuk mensterilkan cairan sebanyak 10 L.

2. Pemanas (*Dry-Heat Sterilization*)

Oven atau pemanas biasa digunakan untuk sterilisasi kering. Sterilisasi pemanasan kering memerlukan suhu yang lebih tinggi serta waktu yang lebih lama dibandingkan sterilisasi menggunakan autoclave. Metode yang sebaiknya dilakukan menggunakan suhu hingga 250°C selama 3 sampai 5 jam, walaupun untuk beberapa kasus memanaskan pada suhu 150°C selama 3 hingga 4 jam sudah cukup.

3. Sterilisasi dengan Penyaringan

Sterilisasi dengan penyaringan (filtrasi) diperlukan untuk komponen yang tidak tahan panas, misalnya vitamin, atau komponen cairan yang mudah menguap, seperti pelarut organik dan sterilisasi media kultivasi. Filter mempunyai ukuran pori kurang dari 0,2 mikron. Ini sangat penting mengingat virus dapat menerobos filter tersebut. Ketika larutan (cairan) memiliki viskositas yang tinggi atau terdiri dari partikel tersuspensi, pra penyaringan dengan filter berukuran 1 mikron sangat diperlukan.

4. Mikrowave Oven Sterilization

Sterilisasi dengan mikrowave oven lebih cepat dibandingkan dengan *steam* atau sterilisasi kering. Panas yang dihasilkan oleh mikrowave terdiri dari 2 tipe, yaitu *ionic polarization* dan *dipole rotation*. Teknik sterilisasi mikrowave tidak beracun dan efektif. Untuk sterilisasi cairan sebanyak 1-1,5 L air laut, mikroalga akan mati

dalam waktu kurang lebih 5 menit, bakteri dalam 8 menit dan jamur akan mati dalam waktu 10 menit.

d. Pola Pertumbuhan Mikroalga

Pola pertumbuhan mikroalga pada sistem kultivasi terbagi menjadi 5 tahap, yaitu :

1. Fase Lag

Fase lag merupakan pertumbuhan fase awal dimana penambahan kelimpahan mikroalga terjadi dalam jumlah sedikit.

2. Fase Eksponensial

Fase eksponensial merupakan tahapan pertumbuhan lanjut yang dialami mikroalga setelah fase lag. Mikroalga yang dikultivasi akan mengalami penambahan biomassa secara cepat.

3. Fase Penurunan Pertumbuhan (*Declining Growth*)

Fase ini terjadi dengan indikasi pengurangan kecepatan pertumbuhan sampai sama dengan fase awal pertumbuhan, yaitu kondisi yang stagnan dimana tidak terjadi penambahan sel.

4. Fase Stasioner

Fase stasioner diindikasikan dengan adanya pertumbuhan mikroalga yang terjadi secara konstan akibat dari keseimbangan katabolisme dan anabolisme di dalam sel.

5. Fase Kematian

Fase kematian diindikasikan oleh kematian sel mikroalga yang terjadi karena adanya perubahan kualitas air ke arah yang buruk, penurunan kandungan nutrisi dalam media kultivasi dan kemampuan metabolisme mikroalga yang menurun akibat dari umur yang sudah tua.

e. Teknik *Harvesting* Mikroalga

Ada beberapa teknik yang digunakan pada proses pemanenan mikroalga atau lebih dikenal sebagai *harvesting*. Teknik ini mencakup teknik mikrofiltrasi, pengendapan gravimetri, sentrifugasi, dan flokulasi (Shelef dan Sukenik, 1984). Selain teknik tersebut, teknik lain yang digunakan untuk *harvesting* mikroalga adalah dengan ultrasonifikasi (Bosma, 2003). Penggunaan sentrifuse sangat layak digunakan jika kultivasi yang dilakukan pada skala laboratorium atau semi massal (Kawaroe *et al.*, 2010).

E. Antioksidan

a. Pengertian Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal radikal bebas dan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Senyawa ini mampu menonaktifkan berkembangnya reaksi oksidasi, yaitu dengan cara antioksidan membentuk radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, sehingga dapat menghambat kerusakan sel (Winarsi, 2007).

Radikal bebas sebenarnya berasal dari molekul oksigen yang secara kimia strukturnya berubah akibat dari aktifitas lingkungan. Aktifitas lingkungan yang dapat memunculkan radikal bebas antara lain radiasi, polusi, merokok dan lain sebagainya. Radikal bebas yang beredar dalam tubuh berusaha untuk merusak elektron yang ada pada molekul lain dalam tubuh, seperti DNA dan sel. Hal ini akan merusak sel dan DNA tersebut. Kerusakan yang ditimbulkan dapat menyebabkan sel tersebut menjadi tidak stabil yang berpotensi menyebabkan proses penuaan dan kanker. Oleh karena itu, diperlukan antioksidan sebagai senyawa pendonor elektron kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut bisa dihambat (Winarsi, 2007).

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat

terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif.

b. Sumber Antioksidan

Berdasarkan sumber perolehannya ada 2 macam antioksidan, yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik) :

1. Antioksidan alami adalah antioksidan yang diperoleh secara alami yang sudah ada pada bahan pangan, baik yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan maupun yang diisolasi dari sumber alami dan digunakan sebagai bahan tambahan makanan. Contoh antioksidan alami antara lain: Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Polifenol, Glutation, asam ellagic, dan lain-lain.
2. Antioksidan Sintetis adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia dan telah diproduksi untuk tujuan komersial. Contoh antioksidan sintetis antara lain: Butil Hidroksi Anisol (BHA), Butil Hidroksi Toluen (BHT), Propil galat, Tert-Butil Hidroksi Quinon (TBHQ), Tokoferol, dan lain-lain (Dalimartha dan Soedibyo, 1999).

c. Analisis Antioksidan

Analisis voltametri untuk studi sifat antioksidan dan penentuan aktivitas sangat nyaman dan sensitif. Analisis komparatif aktivitas antioksidan seperti askorbat dan asam sitrat, glukosa, senyawa larut air, dan beberapa produk makanan (ekstrak teh hijau, cuka apel) dan farmasi (haemodesum, polyglucinum, Ringer solusi) telah dilakukan. Karakter pengaruh antioksidan pada reduksi elektrokimia

oksigen telah diteliti. Metode saat ini diketahui dari penetapan aktivitas antioksidan terutama didasarkan pada penghambatan reaksi oksidasi dengan antioksidan dan pencatatan sinyal kontrol dengan chemiluminescence, kromatografi fasa gas, dan metode lainnya. Pendekatan yang efektif dan nyaman untuk penentuan aktivitas antioksidan dengan merekam reduksi oksigen elektrokimia pada elektroda film merkuri (atau elektroda gelas karbon).

Semua zat yang diteliti menunjukkan aktivitas antioksidan yang berbeda-beda. Seperti yang diharapkan asam askorbat dan glukosa menunjukkan aktivitas antioksidan lebih besar daripada antioksidan lain dalam kisaran konsentrasi yang luas (hingga 5%) (Korotkova *et al.*,2001).

F. Vitamin A

Vitamin A merupakan salah satu jenis vitamin larut dalam lemak yang berperan penting dalam pembentukan sistem penglihatan yang baik. Terdapat beberapa senyawa yang digolongkan ke dalam kelompok vitamin A, antara lain : retinol, retinil palmitat, dan retinil asetat. Akan tetapi, istilah vitamin A seringkali merujuk pada senyawa retinol dibandingkan dengan senyawa lain karena senyawa inilah yang paling banyak berperan aktif di dalam tubuh. Vitamin A banyak ditemukan pada wortel, minyak ikan, susu, keju, dan hati.

Beta karoten, salah satu bentuk vitamin A, merupakan senyawa dengan aktivitas antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas. Senyawa radikal bebas ini banyak berasal dari reaksi oksidasi di dalam tubuh maupun dari polusi di lingkungan yang masuk ke dalam tubuh. Antioksidan di dalam tubuh dapat

mencegah kerusakan pada materi genetik (DNA dan RNA) oleh radikal bebas sehingga laju mutasi dapat ditekan. Penurunan laju mutasi ini akan berujung pada penurunan risiko pembentukan sel kanker. Aktivitas antioksidan juga terkait erat dengan pencegahan proses penuaan, terutama pada sel kulit. Vitamin A memiliki 2 bentuk aktif yang dapat dicerna tubuh, yaitu retinil palmitat dan beta karoten. Retinil palmitat berasal dari makanan hewani, seperti daging sapi, hati ayam, ikan, susu, dan keju. Beta karoten sendiri berasal makanan nabati, seperti bayam, brokoli, dan wortel dan mikroalga (Lee *et al.*, 1996).

Betakaroten adalah pigmen berwarna dominan merah-jingga yang ditemukan secara alami pada tumbuhan dan buah-buahan. Beta karoten merupakan anggota karoten, yang merupakan tetraterpena turunan dari isoprena dan memiliki rantai karbon berjumlah 40. Di antara semua karoten, beta karoten dicirikan dengan keberadaan cincin beta pada kedua ujung molekulnya. Penyerapan beta karoten oleh tubuh meningkat dengan meningkatnya asupan lemak, karena karoten larut oleh lemak.

β -Karoten adalah senyawa yang memberikan warna jingga pada wortel, labu, dan ubi, dan merupakan senyawa karoten yang paling umum pada tumbuhan.

Isolasi beta karoten di dalam buah-buahan umumnya menggunakan metode kromatografi kolom. Pemisahan beta karoten dari campuran dengan senyawa karotenoid lainnya berdasarkan polaritasnya. Beta karoten bersifat non-polar, sehingga dapat dipisahkan dengan pelarut non-polar seperti dimetilsulfoksida (Mercadante *et al.*, 1999).