

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Obesitas

1. Definisi obesitas

Menurut *World Health Organization* (WHO) dan *Centers for Disease Control dan Prevention* (CDC), obesitas didefinisikan sebagai kondisi kompleks kronis yang dapat terjadi pada orang dewasa maupun anak – anak yang disebabkan oleh adanya akumulasi lemak berlebih sehingga menimbulkan berbagai komplikasi (CDC, 2024; WHO, 2024). Akumulasi lemak berlebihan pada penderita obesitas disebabkan oleh tidak selarasnya energi yang dimiliki dengan energi yang dikeluarkan oleh tubuh, sehingga kelebihan energi yang dimiliki akan tersimpan dalam sel lemak (Midah dkk., 2021). Presentase akumulasi lemak yang berlebihan pada penderita obesitas menyentuh angka 120% dari berat badan ideal yang mengakibatkan adanya gangguan pada sistem organ (Artha dkk., 2019; Mulyani dkk., 2020)

Obesitas juga didefinisikan sebagai salah satu bentuk malnutrisi yang merupakan konsekuensi akibat konsumsi makanan yang tidak terkontrol sehingga melampaui kebutuhan (Salim, Wihdanani dan Dewi, 2021). Konsumsi makanan yang tidak terkontrol dapat terjadi akibat terdapat gangguan pada pengaturan nafsu makan dan metabolisme energi yang dipengaruhi oleh beberapa faktor biologis (Mokolensang dan Manampiring, 2016).

2. Klasifikasi obesitas

Obesitas dapat diklasifikasikan dengan melakukan perhitungan terhadap indeks masa tubuh yang merupakan salah satu indikator universal yang seringkali digunakan oleh praktisi kesehatan (Dalimunthe, 2022). Indeks masa tubuh (IMT) merupakan salah satu cara pengukuran yang digunakan untuk menentukan status gizi seseorang (Sugiarti dan Latifah, 2017). Indeks masa tubuh merupakan proporsi antara berat badan dan tinggi badan (kg/m^2) seseorang yang digunakan untuk memperkirakan presentase lemak tubuh dengan mudah dan mengelompokkannya ke dalam beberapa kategori (Lorenzo, 2016).

Perhitungan indeks masa tubuh dapat dilakukan dengan menggunakan rumus perhitungan berikut.

$$\text{Indeks Masa Tubuh (IMT)} = \frac{\text{Berat badan (Kg)}}{\text{Tinggi badan (m}^2\text{)}}$$

Perhitungan indeks masa tubuh hanya bisa digunakan untuk individu yang memiliki susunan tulang belakang yang normal, bukan atlet maupun binaragawan, dan bukan wanita menyusui (Danarsih, Artini dan Purnamaningsih, 2023).

Menurut *World Health Organization* (WHO), indeks masa tubuh terhadap orang asia dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Tabel 1
Klasifikasi Obesitas

Klasifikasi	IMT (kg/m^2)
Berat badan kurang	< 18,5
Normal	18,5 – 22,9
Berat badan lebih	≥ 23
Berisiko	23 – 24,9
Obesitas I	25 – 29,9

Klasifikasi	IMT (kg/m ²)
Obesitas II	≥ 30

(WHO, 2024)

Kelebihan dan kekurangan berat badan akan menimbulkan berbagai masalah kesehatan. Berat badan yang kurang akan berdampak pada peningkatan penularan penyakit infeksi, seseorang dengan berat badan berlebih akan semakin riskan terhadap penyakit degeneratif seperti hiperkolesterol, diabetes melitu, hipertensi, maupun gangguan lainnya terhadap sistem metabolik. (Salim, Wihdanani dan Dewi, 2021).

3. Patofisiologi obesitas

Obesitas didasarkan pada kondisi fisiologis yang mendasari bahwa akumulasi lemak berlebih berkaitan dengan ketidakseimbangan energi antara kalori yang dikonsumsi dan dihabiskan (Lin dan Li, 2021). Akumulasi metabolisme lipid, pensinyalan inflamasi, atau gangguan neuron hipotalamus juga dapat menjelaskan bagaimana proses terjadinya peningkatan masa lemak tubuh (Lin dan Li, 2021). Adanya gangguan ketidakseimbangan antara energi akibat faktor eksogen (obesitas primer) dan faktor endogen (obesitas sekunder). Faktor eksogen merupakan akibat dari nutrisi sedangkan faktor endogen merupakan akibat dari adanya kelainan dalam hormonal, sindrom, maupun efek genetik (Gadde dkk., 2018).

Obesitas juga dipengaruhi dengan riwayat keluarga, gaya hidup, dan faktor psikologis yang dapat meningkatkan risiko obesitas, seorang anak yang memiliki riwayat keluarga dengan obesitas, akan lebih berisiko mengalami obesitas akibat adanya faktor genetik (Lin dan Li, 2021). Kecenderungan yang mengarah pada obesitas teridentifikasi ada 140 gen kromosom genetik yang berkaitan dengan obesitas. Ekspresi gen ini berkaitan dengan indeks masa tubuh dan adipositas yang

didukung dengan sistem saraf pusat, gen ini yang akan memberikan kode komponen pensinyalan leptin dan melanocortin (Gadde dkk., 2018).

Leptin diproduksi selaras dengan akumulasi energi yang tersimpan dalam bentuk lemak diperoleh dari akumulasi lemak yang berlebihan pada individu obesitas. (Izquierdo dkk., 2019). Melalui sirkulasi darah, leptin akan menuju hipotalamus dan *α -Melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSH) merupakan mediator dari alurnya. Sintesis serta sekresi dari *α -Melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSH) oleh nukleus arkuatus hipotalamus akan diatur oleh reaksi yang terjadi antara leptin dengan reseptornya pada sistem saraf yang disertai dengan perubahan *proopiomelanocortin* (POMC) menjadi (α -MSH) (Izquierdo dkk., 2019). *α -Melanocyte Stimulating Hormone* (α -MSH) akan menekan pusat lapar melalui sirkulasi darah ke perifer yang akan meningkatkan metabolisme yang akan mempercepat lipolisi pada jaringan adiposa (Salim, Wihdanani dan Dewi, 2021).

4. Faktor resiko obesitas

Kondisi obesitas tidak terjadi begitu saja, melainkan terapat beberapa faktor yang dapat memicu kondisi obesitas, diantaranya sebagai berikut :

a. Lingkungan

Faktor lingkungan merupakan salah satu faktor utama yang mengakibatkan tidak selarasnya energi yang masuk dan energi yang dikeluarkan. Hal ini berkaitan dengan adanya perubahan pola hidup yang berpengaruh pada *sedentary life style*. Terdapat perubahan gaya hidup yang mengakibatkan adanya perbedaan pada pola konsumsi masyarakat yang mengacu pada konsumsi makanan dengan tinggi kalori, lemak, dan kolesterol sehingga berdampak akan meningkatkan risiko obesitas (Mokolensang dan Manampiring, 2016).

b. Genetik

Kondisi kelebihan berat badan atau obesitas seseorang berkorelasi dengan adanya pengaruh genetik. Apabila ayah dan ibu memiliki berat badan yang berlebih, maka terdapat kemungkinan sekitar 30 – 50% sang anak juga akan menderita obesitas. Namun, apabila ayah dan ibu termasuk dalam kategori obesitas, maka kemungkinan anak akan mengalami kondisi obesitas sebesar 60 – 80% (Lubis dkk., 2020).

c. Jenis kelamin

Jenis kelamin merupakan faktor risiko dari obesitas yang disebabkan oleh adanya perbedaan pada kualitas aktivitas fisik maupun asupan energi antara perempuan dan laki – laki yang dipengaruhi oleh sistem metabolisme pada perempuan lebih lambat dari pada laki – laki. Perempuan akan mengubah asupan energi yang menjadi lemak, sedangkan laki – laki akan mengubah asupan energi yang masuk menjadi otot dan cadangan energi siap pakai (Fahdhienie, 2023).

d. Usia

Semakin bertambahnya usia akan mengakibatkan kondisi penurunan masa otot disertai dengan adanya perubahan hormon yang akan berdampak pada penurunan metabolisme tubuh. Pada usia ini, kinerja organ akan mengalami penurunan sebagai konsekuensi dari proses degeneratif (penuaan). Penurunan fungsi fisiologis ini akan mengakibatkan penurunan aktivitas fisik sehingga akan meningkatkan kemungkinan terjadi kondisi obesitas (Makmun dan Radisu, 2021).

B. Lanjut usia

Lanjut usia didefinisikan sebagai seseorang yang sedang mengalami jenjang terakhir dalam kehidupan manusia dan terjadi proses penuaan atau proses degeneratif (Lusiani Arfini dan Utami Wahyuningsih, 2022; St. Maryam, Baits dan Tahir, 2023). Lanjut usia dapat didefinisikan sebagai salah satu kelompok atau populasi berisiko yang terus mengalami peningkatan dalam kuantitasnya. Populasi berisiko diartikan sebagai kumpulan orang dengan masalah kesehatan tertentu dan berpotensi akan berkembang menjadi lebih buruk akibat adanya faktor – faktor risiko yang mempengaruhi (Nikmah dan Khomsatun, 2020). Menurut Dyussenbayey (2017) individu lanjut usia dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kategori, yaitu :

1. Usia pertengahan (*middle age*) : usia 45- 59 tahun
2. Lanjut usia (*elderly*) : usia 60-74 tahun,
3. Lanjut usia tua (*old*) : usia 75-90 tahun
4. Usia sangat tua (*very old*) : usia di atas 90 tahun

Fungsi fisiologis seperti sistem respirasi, muskuloskeletal, kardiovaskular, gangguan kognitif dan masa lemak tubuh akan mengalami penurunan yang selaras dengan bertambahnya usia. Selain fungsi fisiologis, fungsi imunitas pada lanjut usia juga mengalami penurunan. Pada lanjut usia, akan terjadi penurunan produksi immunoglobulin, sehingga tubuh akan kehilangan kemampuan membedakan benda yang masuk ke dalam tubuhnya atau benda tersebut juga merupakan bagian dari tubuhnya sendiri (*autobody immune*). Penyakit yang diderita oleh lanjut usia didominasi oleh penyakit tidak menular, penyakit kronik dan degeneratif seperti hipertensi, penyakit paru obstruktif kronik, dan diabetes melitus. Seorang lanjut

usia rentan mengalami berbagai masalah kesehatan sehingga akan berdampak terhadap kualitas hidupnya (Safiq, Badriyah dan Fikawati, 2021).

C. Radikal Bebas

1. Definisi radikal bebas

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai satu molekul atau fragmen molekul dengan elektron yang tidak berpasangan pada orbit terluarnya (Karundeng dan Aloanis, 2018). Jumlah ganjil pada elektron yang dimiliki oleh radikal bebas membuatnya menjadi tidak stabil, masa hidupnya pendek dan sangat reaktif. Tingkat reaktivitas yang tinggi mengakibatkan radikal bebas dapat mengubah susunan elektron yang dimiliki oleh senyawa lain untuk mencapai stabilitasnya. Dengan demikian molekul yang dirubah susunan elektronnya akan kehilangan elektronnya dan akan terbentuk radikal bebas itu sendiri dan memicu mulainya reaksi berantai yang merusak sel hidup (Phaniendra, Jestadi dan Periyasamy, 2015).

Radikal bebas didapatkan dari pemutusan hemolitik, yang terjadi secara alami maupun yang dipengaruhi oleh kehadiran manusia. Pada kondisi tubuh yang sehat radikal bebas akan diselaraskan oleh sistem imun, ketika sistem imun tidak berkemampuan untuk menangkal aktivitas radikal bebas, maka akan terjadi kerusakan pada yang disebabkan oleh reaksi oksidasi. Kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas akan berbagi penyakit kronis seperti parkinson, penyakit alzheimer, kanker, penuaan, serangan jantung, penyakit kardiovaskular, katarak, peradangan, dan berbagai penyakit lainnya (Karundeng dan Aloanis, 2018)

Radikal bebas merupakan bagian dalam proses kerusakan Tingkat sel dan jaringan terkait usia. Radikal bebas merupakan pemeran utama dalam proses penuaan yang termodifikasi oleh genetik dan faktor lingkungan. Oksigen radikal

bebas merupakan pemeran utama dalam kerusakan tingkat sel dan jaringan sebagai akibat dari reaktivitasnya yang tinggi. Akumulasi dari radikal oksigen yang terdapat di sel akan merubah oksidatis molekul biologi (lipid, protein dan asam nukleat) yang akan mengakibatkan terjadinya penuaan serta kematian sel (Zalukhu dkk., 2016).

2. Jenis – jenis radikal bebas

a. Superoxide Radical

Oksigen molekuler (*dioxygen*) akan membentuk radikal anion superoksida ketika menerima elektron. Anion superoksida selama proses transportasi elektron mitokondria selama fase produksi ATP. Radikal jenis ini merupakan *radical oxygen species* (ROS) primer yang dapat menghasilkan *radical oxygen species* (ROS) sekunder akibat adanya interaksi dengan molekul lain secara langsung maupun tidak langsung dengan reaksi enzimatik (Ifeanyi, 2018)

Superoxide radical dapat bertahan dalam kurun waktu yang relatif lebih lama dan berdifusi ke jarak yang signifikan. Metabolisme oksidatif oleh xenobiotic yang melibatkan sistem enzim sitokrom P450 hati, pemulihan dari cedera sehingga akan menghasilkan superoksida yang kemudian diubah menjadi H_2O_2 oleh *Superoxide dismutase* (SOD). Selanjutnya dirubah menjadi menjadi air oleh radikal OH yang sangat reaktif dan dapat menyebabkan kerusakan. H_2O_2 akan diubah menjadi oksigen singlet yang bukan merupakan radikal bebas, oksigen singlet ini akan berperan sebagai katalis dalam pembangkitan radikal bebas dengan memberikan energi ke molekul baru (Reena, 2018).

b. Nitric Oxide Free Radical

Oksida nitrat radikal bebas fisiologis yang dihasilkan oleh endotel vascular sebagai faktor relaksasi memiliki banyak fungsi fisiologis yang berguna, tetapi oksida nitrat yang berlebihan dapat menjadi racun bagi organisme hidup karena afinitasnya terhadap oksidan. Setelah reaksi dengan radikal oksida nitrat akan diubah menjadi radikal bebas peroksi nitrit yang tidak stabil yang bertanggung jawab atas efek sitotoksiknya (Reena, 2018).

c. Hydroxy Free Radical

Radikal bebas jenis ini merupakan radikal bebas yang sangat reaktif yang terbentuk oleh dua cara dalam proses biologis yaitu dengan radiolysis air dan reaksi hidrogen peroksida dengan ion. Hydroxy free radical memiliki masa hidup yang singkat karena bereaksi di tempat pembentukannya. Biasanya, akan meninggalkan sisa dalam bentuk reaksi berantai radikal bebas yang menyebarkan dan menyebabkan kerusakan sel (Reena, 2018).

3. Stres oksidatif

Stres oksidatif berkorelasi dengan berbagai keadaan patologis seperti penyakit kardiovaskular, kanker, dan lain lain. Stress oksidatif dapat didefinisikan sebagai suatu kondisi yang diakibatkan oleh tidak selarasnya kadar radikal bebas atau prooksidan dan antioksidan yang disebabkan oleh adanya dua keadaan yaitu kurangnya antioksidan serta kelebihan produksi radikal bebas. Tingginya kadar radikal bebas di dalam tubuh yang tidak selaras dengan antioksidan akan menimbulkan kerusakan pada sel, terutama pada sel lemak, dan DNA. Perubahan struktur kimia DNA dapat terjadi apabila ada interaksi antara *Reactive Oxygen Species* dengan salah satu basa dari DNA, apabila struktur DNA tidak diperbaiki

akan menyebabkann mutasi gen yang akan berujung pada keganasan sel kanker (Midah dkk., 2021).

Lipid atau lemak adalah bagian dari penyusun membran sel berupa asam lemak tak jenuh ganda. Pada lipid, hydrogen peroksida akan membentuk rantai reaksi degenerasi oksidatif yang merupakan suatu kondisi dimana radikal bebas akan mengurtip elektron yang dimiliki oleh lipis yang akan menyebabkan kerusakan pada sel yang terjadi melalui mekanisme reaksi berantai dari radikal bebas. Proses ini akan mempengaruhi asam lemak tak jenuh ganda, akibat terdapat banyak atom hydrogen yang sangat reaktif. Seperti reaksi radikal lainnya yang terdiri dari inisiasi, propogasi, dan terminasi (Midah dkk., 2021).

Inisiasi adalah proses dimana asam lemak radikal Tengah dibuat, inisiator dalam jumlah banyak pada sel adalah *Reactive Oxygen Species* (ROS), seperti OH dan HOO, yang berkemampuan untuk bergabung dengan atom hidrogen sehingga akan diperoleh air dan asam lemak radikal. Asam lemak radikal adalah bentuk molekul stabil yang dapat dengan mudah untuk bereaksi dengan molekul oksigen yang akan menghasilkan asam lemak radikal peroksil yang merupakan spesies radikal tidak stabil yang akan bereaksi dengan berbagai asam lemak bebas lainnya, sehingga akan diperoleh asam lemak radikal dan lipid peroksida yang berbeda, atau peroksida siklik jika ia bereaksi dengan dirinya sendiri. Ketika radikal bereaksi dengan non-radikal, akan menghasilkan bentuk radikal lain. Reaksi radikal akan terhenti apabila dua radikal bereaksi sehingga akan membentuk spesies non radikal. Hal ini dapat terjadi apabila konsentrasi spesies radikal yang relatif tinggi sehingga akan terjadi benturan antara dua radikal (Midah dkk., 2021).

4. Sistem imunitas tubuh

Pada kondisi normal, terdapat keselarasan antara kadar radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh. Antioksidan adalah molekul yang bisa menstabilkan atau menonaktifkan molekul radikal bebas sebelum menyerang sel (Reena, 2018). Selain itu, antioksidan juga dapat menghambat atau menunda proses oksidasi sebuah susbtrat. Didasarkan pada sumbernya, antioksidan dapat diklasifikasi menjadi antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen dapat didefinisikan sebagai enzim – enzim yang bersifat antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, dan glutathione peroksidase. Sedangkan antioksidan eksogen dapat didefinisikan sebagai antioksidan yang diperoleh dari luar tubuh atau makanan (Danarina & Djauhari, 2017).

Antioksidan merupakan molekul alami yang dapat digunakan untuk mengendalikan kerusakan stress oksidatif dalam entitas biologis. Antioksidan akan memperlambat atau mencegah proses oksidasi yang akan mengakibatkan terjadinya kerusakan sel – sel tubuh. Hal ini dapat terjadi akibat molekul antioksidan yang teroksidasi sendiri sebagai pengganti sel, dengan demikian antioksidan juga dapat disebut sebagai zat pereduksi. Antioksidan mengambil peran penting alam mengendalikan kerusakan akibat radikal bebas yang dihasilkan karena stres oksidatif (Werdhasari, 2018).

D. *Superoxide Dismutase* (SOD)

1. Definisi *Superoxide dismutase*

Superoxide dismutase (SOD) merupakan enzim detoksifikasi pertama dan antioksidan yang paling kuat di dalam sel. *Superoxide dismutase* ini merupakan enzim antioksidan endogen yang berperan penting sebagai komponen sistem pertahanan terhadap spesies *Reactive Oxygen Species* (ROS). *Superoxide dismutase* (SOD) dapat ditemukan dalam sitosol dan mitokondria. *Superoxide dismutase* (SOD) merupakan metaloenzim yang membutuhkan kofaktor logam untuk aktivitasnya. Berdasarkan jenis ion logam yang dibutuhkan sebagai kofaktor oleh *Superoxide dismutase* (SOD) besi (Fe), seng (Zn), tembaga (Cu), dan mangan (Mn) (Ighodaro dan Akinloye, 2018).

2. Mekanisme kerja *superoxide dismutase*

Enzim *superoxide dismutase* (SOD) akan merubah radikal superoksida menjadi hidrogen peroksida yang bersifat reaktif. Peroksida akan dikatalisis oleh enzim katalase dan glutathion peroksidase. Katalase akan menggunakan satu molekul H_2O_2 sebagai substrat elektron yang akan merubah molekul H_2O_2 menjadi $2\text{H}_2\text{O}$ dan O_2 (Werdhasari, 2018).

Pada eritrosit dan jaringan lain, enzim glutathion peroksidase akan mengkatalisis destruksi H_2O_2 dan lipid hiperperoksida dengan glutathion yang sudah direduksi, melindungi lipid membrane dan hemoglobin dari gangguan oksidasi oleh H_2O_2 sehingga akan mencegah timbulnya hemolysis akibat peroksida. Glutathion yang direduksi akan dioksidasi akan menjadi GS – SG. Supaya GSH terus ada sebagai pembantu kinerja enzim GPx, maka GS-SG akan direduksi kembali menjadi GSH (Werdhasari, 2018)

H_2O_2 yang tidak dirubah menjadi H_2O akan membentuk radikal hidroksil reaktif (OH) apabila bereaksi dengan ion logam transisi ($\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$). OH cenderung lebih reaktif dan berbahaya karena akan dapat merusak sel melalui peroksidasi lipid, protein, dan DNA. Sedangkan, tubuh tidak memiliki enzim yang berkemampuan untuk mengkonversi OH menjadi molekul senyawa yang lebih aman bagi sel (Werdhasari, 2018).

3. Metode pemeriksaan

Kadar superoxide dismutase dapat dimonitoring dengan berbagai metode, diantaranya sebagai berikut :

a. *Nitro blue tetrazolium* (NBT)

Salah satu teknik umum yang sering digunakan untuk pengukuran kadar superoxide dismutase adalah *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) yang akan bertindak sebagai indikator terhadap perubahan warna saat tereduksi oleh anion superoksida. Ketika *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) bereaksi dengan anion superoksida akan membentuk NBT – diformazan yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang 550 nm. *Superoxide dismutase* akan menurunkan laju pembentukan NBT – diformazan. Penurunan pembentukan NBT – diformazan ini akan mempengaruhi representasi aktivitas SOD pada sampel pemeriksaan (St Khaerunnisa, dkk., 2015)

b. *Water soluble tetrazolium salt – 1* (WST-1)

Water Soluble Tetrazolium Salt – 1 memiliki rumus kimia 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4- disulfophenyl)-2H- tetrazolium monosodium salt yang dapat menghasilkan pewarna formazan yang larut dalam air saat reduksi dengan O_2 . Prinsip pemeriksaan ini adalah radikal bebas atau superoxide yang bereaksi

dengan WST – 1 yang akan menghasilkan pewarna formazan berwarna kuning. Superoxide dismutase akan berkompetisi dengan WST -1 untuk bereaksi dengan superoxide yang akan memperlambat proses pembentukan zat warna. Kadar *superoxide dismutase* akan diukur melalui derajat inhibisi pembentukan warna pada panjang gelombang 450 nm yang dapat menganalisis perubahan warna akibat reaksi antara WST – 1 menjadi WST – 1 formazan (Pratiwi *dkk.*, 2022).

c. *Enzyme – linked immunosorbent assay* (ELISA)

Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) didasarkan pada prinsip reaksi antara antigen dan antibodi yang mewakili interaksi antara antibodi yang diproduksi oleh sel B leukosit dan antigen. Respon imun yang secara khusus mengambil peran penting dalam upaya sistem pertahanan tubuh dari patogen maupun racun. ELISA menyediakan peluang untuk dilakukan analisis secara kuantitatif maupun kualitatif terhadap antigen yang sensitive dan selektif, termasuk protein, peptida, asam nukleat, hormone, herbisida, dan metabolit sekunder tanaman (Sakamoto *dkk.*, 2018).

Dalam upaya untuk mendeteksi reaksi, antigen dan antibodi diberikan label dengan menggunakan enzim yang dikenal dengan nama enzim *immunoassay*, dimana alkali fosfatase horseradish peroksidase, dan β – galaktosidase yang sering digunakan. Antigen akan dimonilisasi pada fase padat, kemudian antigen akan bereaksi dengan antibodi tertentu yang akan diidentifikasi oleh antibody sekunder dengan label enzim. Reaksi ini umumnya berlangsung selama 30 sampai 60 menit yang dilakukan dengan penambahan larutan yang sesuai seperti asam klorida, natrium karbonat, asam sulfat, natrium hidroksida, dan antrium azida untuk satu

reaksi. Pada tahap akhir reaksi, akan terbentuk produk berwarna yang dideteksi dengan *microtiter* (Sakamoto dkk., 2018).

Substrat kromogenik akan menimbulkan reaksi berupa perubahan warna atau fluoresensi yang terlihat yang menginterpretasikan adanya antigen. Pengukuran secara kuantitatif maupun kualitatif dapat diamati dengan melakukan pembacaan kalorimetri. Substrat fluorogenik memiliki sensitivitas yang relatif lebih tinggi dan bisa diukur dengan akurat untuk mengetahui konsentrasi antigen pada sampel (Dita, 2021).

1) Jenis – jenis ELISA

a) ELISA *Direct*

Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA) *direct* merupakan deteksi langsung yang melibatkan pelabelan enzim pendeteksi dengan enzim atau molekul pensinyalan alternative. Metode ELISA direct ini umumnya dapat dilakukan dalam waktu yang lebih singkat dibandingkan dengan ELISA indirect. Dalam kondisi yang cukup baik, ELISA direct tidak dapat memberikan amplifikasi sinyal yang diperoleh dari penggunaan antibodi sekunder, sehingga hasil yang diperoleh kurang sensitive (Dita, 2021).

b) ELISA *indirect*

Sampel yang harus dianalisis untuk antigen spesifik dilekatkan ke pada *well* yang ada di pelat microtiter, kemudian dilakukan penambahan larutan protein yang tidak bereaksi untuk menutup area *well* yang tidak terlapisi antigen. Dilakukan penambahan antibodi primer akan mengikat antigen secara khusus yang diikuti dengan penambahan antibody sekunder yang telah terkonjugasi oleh enzim. Substrat untuk enzim akan diidentifikasi untuk mengetahui konsentrasi antibodi

primer melalui perubahan warna. Konsentrasi antibodi primer akan selaras dengan intensitas warna yang terbentuk (Dita, 2021).

c) *ELISA Sandwich*

ELISA sandwich digunakan untuk melakukan identifikasi terhadap sampel antigen tertentu. Pada permukaan well dipersiapkan dengan jumlah antibodi terikat yang telah diketahui agar bereaksi dengan antigen yang diinginkan. Setelah terciptanya reaksi antara antibodi dengan antigen akan dihentikan dengan menggunakan albumin serum, sampel dengan kandungan antigen akan dioleskan ke pelat. Kemudian dilakukan penambahan antibodi primer yang spesifik untuk bereaksi dengan antigen. Antibodi sekunder berkorelasi dengan enzim yang mengikat antibodi primer. Pasangan antibodi dan antigen akan dicuci kemudian subtract ditambahkan dan secara enzimatik akan diubah menjadi warna yang dapat diukur. Keuntungan penggunaan antibodi khusus yang dimurnikan untuk bereaksi dengan antigen adalah karena dapat menghilangkan kebutuhan untuk pemurnian antigen dari antigen lain, sehingga akan mempersingkat proses pengujian dan meningkatkan spesifitas maupun sensitivitas pengujian (Dita, 2021).

E. Jeruk Bali (*Citrus Maxima*)



Gambar 1 Jeruk Bali (*Citrus maxima*)
Sumber : Data primer (2025)

1. Klasifikasi jeruk bali (*Citrus maxima*)

Klasifikasi jeruk bali adalah sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*
Subkingdom : *Tracheobionta*
Superdivisi : *Spermatophyta*
Divisi : *Magnoliophyta*
Kelas : *Magnoliopsida*
Subkelas : *Rosidae*
Ordo : *Sapindales*
Famili : *Rutaceae*
Genus : *Citrus*
Spesies : *Citrus maxima*

2. Morfologi jeruk bali (*Citrus Maxima*)

Tanaman jeruk merupakan salah satu jenis flora hortikultura yang dapat dikembangkan dengan nilai ekonomis yang tinggi karena banyak disukai oleh masyarakat baik berupa buah segar maupun telah diolah. Selain daging buahnya, bagian kulit jeruk bali dan bijinya pun bisa diolah menjadi produk dengan nilai ekonomi yang cukup tinggi (Adlini dan Umaroh, 2021).

Morfologi dari tanaman jeruk bali adalah memiliki struktur pohon dengan batang yang tegak disertai dengan kulit batang berwarna coklat muda keabu – abuan. Pohon ini dapat tumbuh hingga mencapai 15 meter dengan batang yang bercabang dan bertajuk rimbun. Daun dari pohon jeruk bali berbentuk bulat telur, memiliki permukaan yang halus dan sedikit mengkilap. Memiliki bunga dengan ukuran yang besar dan berjumlah kelipatan lima. Serta buah jeruk bali dengan bentuk bulat lonjong berwarna hijau pada kulit buahnya apabila masih muda dengan ketebalan kulit berkisar 1,0 cm – 1,4 cm (Tricamila, Agustin dan Adlina, 2024).

3. Kandungan dan manfaat jeruk bali (*Citrus Maxima*)

Jeruk bali memiliki berbagai kandungan metabolit sekunder diantaranya flavonoid, pektin, dan lyvopene ayang bermanfaat bagi manusia. Senyawa metabolit sekunder yang dimiliki oleh jeruk bali bermanfaat dalam upaya meningkatkan daya tahan tubuh dan membantu meningkatkan kadar antioksidan yang akan membandu meredam aktivitas radikal bebas (Barqy, 2021).

4. Kulit jeruk bali (*Citrus Maxima*)

Kulit jeruk bali berukuran lebih tebal dibandingkan dengan jeruk lainnya, dengan bau yang khas karena mengandung minyak atsiri dan senyawa limonin

(Suryanita dkk., 2019). Didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Pariury dkk (2021) menyatakan bahwa, sebaaiaan besar kandungan antioksidan dan vitamin C terdapat pada kulitnya.

Penelitian yang dilakukan oleh Suryanita (2019) dan Apriliapatni (2023) menunjukkan bahwa pada kulit jeruk bali terdapat kandungan alkaloid, flavonoid, dan tanin. Alkaloid yang terkandung dalam kulit jeruk bali dapat bertindak sebagai antioksidan karena terdapat atom nitrogen pada struktur kimianya yang memiliki pasangan elektron bebas sehingga mampu meredam aktivitas antioksidan di dalam tubuh (Hasan dkk., 2022). Kandungan flavonoid pada kulit jeruk bali berfungsi sebagai antioksidan, antiinflamasi, melindungi struktur sel dan mampu mereduksi radikal bebas (Suryanita dkk., 2019). Tanin dalam kulit jeruk bali mampu bertindak sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan dalam melawan radikal bebas pada tubuh sehingga akan membantu menanggulangi kerusakan sel dan penuaan dini (Tricamila, Agustin dan Adlina, 2024).

F. Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*)



Gambar 2 Daun Stevia (*Stevia rebaudiana*)

Sumber : Marlina (2018)

Klasifikasi tanaman *Stevia reabudiana*, adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Sub Divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledeneae</i>
Ordo	: <i>Companulatae</i>
Famili	: <i>Compositae (Asteraceae)</i>
Genus	: <i>Stevia</i>
Spesies	: <i>Stevia rebudiana Bortoni</i>

Tanaman stevia adalah tanaman perdu kecil yang bisa tumbuh hingga 65 cm. tanaman setvia ini hidup dan berkembang di tanah berpasir yang berada di sekitaran sungai dengan daun tombak yang memiliki susunan berlawanan, bergerigi, memiliki bunga yang kecil berwarna putih, serta terdapat biji yang berwarna kecokelatan dengan pappus berbulu (Siagian dan Bintoro, 2019)

Bagian daun pada tanaman stevia adalah pemanis alami dengan tingkat kemanisan mencapai 100 – 200 kali lebih manis dibanding dengan sukrosa yang tidak memiliki efek karsinogenik (Qorry Aina dkk., 2019). Komponen utama dari daun stevia adalah steviosida dan rebaudiosida yang menciptakan rasa manis (Siagian dan Bintoro, 2019). Selain itu, dalam daun stevia juga terdapat kandungan alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin (Apriliapatni dkk., 2023)

G. Teh Kombinasi Kulit Jeruk Bali (*Citrus maxima*) dan Daun Stevia (*Stevia rebaudian*)

Jeruk bali (*Citrus maxima*) dan daun stevia (*Stevia rebaudiana*) akan dikombinasikan sebagai minuman yang memiliki potensi kandungan antioksidan. Teh dapat didefinisikan sebagai minuman seduhan yang dihasilkan dari daun, kulit, akar, bunga, tumbuhan lain selain tanaman teh (Karta, Anndan Kurnia Iswari dan Nanamy Khrisnashanti Eva Susila, 2019). Selain itu, teh juga merupakan minuman

seduhan yang digemari oleh masyarakat Indonesia yang bermanfaat bagi kesehatan (Leonardo, Taufik dan Rianawati, 2019).

Pada penelitian ini akan dipergunakan kulit dari jeruk bali serta daun stevia yang akan diolah hingga menjadi minuman seduhan dalam bentuk teh. Kandungan kulit jeruk yang berupa antioksidan akan membantu dalam meningkatkan kadar Superoxide dismutase. Selain itu, senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, dan tanin yang juga berkemampuan untuk bertindak sebagai antioksidan dalam upaya meredam aktivitas radikal bebas. Selain itu, pada daun stevia juga mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin yang juga dapat berperan sebagai antioksidan sehingga mampu meredam aktivitas radikal bebas.

Pemanfaatan kedua bahan alam tersebut diharapkan dapat membantu dalam upaya meningkatkan kadar Superoxide dismutase di dalam tubuh sehingga mampu menurunkan aktivitas radikal bebas yang menyebabkan terjadinya kerusakan sel.

H. Tanaman Teh (*Camellia sinensis*)



Gambar 3 Tanaman Teh (*Camellia sinensis*)

Sumber : Namita, Mukesh dan Vijay (2016)

Dalam dunia tumbuh – tumbuhan, taksonomi teh (*Camellia sinensis*) dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*
Sub Divisi : *Agniospermae*
Kelas : *Dicotyledone*
Ordo : *Guttiferales*
Famili : *Theaccaeae*
Genus : *Camellia*
Spesies : *Camellia sinensis*

Teh (*Camellia sinensis*) adalah salah satu jenis flora yang populer untuk diolah sebagai minuman. Dalam proses pengolahannya, tanaman teh dapat dikembangkan menjadi berbagai jenis teh, diantaranya sebagai berikut :

1. Teh Hitam

Proses pengolahan teh hitam terdiri dari proses pelayuan, penggilingan, sortasi basah, fermentasi, pengeringan, sortasi kering, dan penyimpanan (Wardani dan Ferry Ferndana, 2016). Teh hitam memanfaatkan oksidasi enzimatis terhadap kandungan teh dan mengalami proses fermentasi yang paling lama (Ramdan, Yusuf dan Setiawan, 2023).

Teh hitam mengandung polifenol, alkaloid, minyak volatil, polisakarida, asam amino, lemak, vitamin, dan lain-lain. Namun, kandungan utama dari teh merupakan antioksidan polifenol yaitu katekin. Antioksidan polifenol ini berperan sebagai senyawa yang meredam aktivitas radikal bebas yang ada di dalam tubuh sehingga akan mengurangi risiko penyakit jantung dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Purwanti, 2019).

Fase fermentasi yang cukup lama pada proses pembuatan teh hitam menimbulkan terbentuknya senyawa kafein yang dapat memberikan dampak

negatif apabila dikonsumsi secara terus menerus. Kafein akan menimbulkan berbagai reaksi yang tidak dikehendaki seperti, insomnia, gelisah, pernafasan yang meningkat, tremor, dan diuresis (Ramdan, Yusuf dan Setiawan, 2023).

I. Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan merupakan serangkaian prosedur pemeriksaan yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu senyawa maupun ekstrak dalam menghambat atau mengurangi kerusakan akibat radikal bebas atau kondisi stress oksidatif. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan berbagai metode yang akan memberikan hasil pengujian yang berbeda – beda akibat pengaruh struktur kimia antioksidan, sumber radikal bebas, dan sifat fisikokimia (Nugraheni *dkk.*, 2024). Metode pemeriksaan untuk pengujian aktivitas antioksidan adalah sebagai berikut :

1. Metode DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

Prinsip dari pemeriksaan ini adalah reaksi oksidasi – reduksi. DPPH adalah radikal bebas sinetik dan bisa larut dalam air seperti ethanol dan methanol (Purwanti, 2019). DPPH akan bereaksi dengan 2 cara yaitu mekanisme donor atom hydrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron. Adanya aktivitas antioksidan akan ditandai dengan berubahnya larutan berwarna ungu menjadi berwarna kuning akibat tereduksinya DPPH oleh senyawa antioksidan sehingga menjadi DPPH – H. Perubahan warna ini merepresentasikan jumlah elektron yang diterima oleh DPPH dan menentukan seberapa kuat aktivitas antioksidannya. Intensitas warna yang terbentuk akan dibaca pada panjang gelombang 517 nm (Aryanti, Perdana dan Mahendra, 2021)

2. Metode ABTS (*2,2'-azino-bis 3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid*)

ABTS merupakan salah satu metode pengujian untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang menggunakan senyawa 2,2'-azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) sebagai penghasil radikal bebas. ABTS adalah substrat yang dipeceleh dari enzim peroksidase yang teroksidasi oleh peroksida. Metode pemeriksaan ini berprinsip bahwa kemampuan dari senyawa antioksidan dalam upaya stabilisasi radikal bebas dengan cara memberikan proton kepada radikal bebas yang ditandai adanya perubahan warna dari biru kehijauan menjadi tidak berwarna yang menginterpretasikan tereduksinya kation dari radikal ABTS (Aryanti, Perdana dan Mahendra, 2021).

3. Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini berprinsip bawah kemampuan antioksidan dalam melakukan reduksi kompleks ferri (Fe^{3+}) dari ferri-tripyridyl-triazine (TPTZ) menjadi kompleks ferro (Fe^{2+}) yang diinterpretasikan dengan terbentuk perubahan warna menjadi warna biru yang diamati pada panjang gelombang 593 nm (Aryanti, Perdana dan Mahendra, 2021). Metode FRAP menggunakan senyawa antioksidan sebagai agen pereduksi (reduktan) dalam reaksi reduksi-oksidasi (Fidrianny, Choirunnisa dan Ruslan, 2016).

4. Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Reaksi reduksi – oksidasi yang terbentuk antara antioksidan dan radikal bebas merupakan konsep dasar dari pemeriksaan aktivitas antioksidan metode CUPRAC, metode ini dapat diukur melalui reduksi dari ion cupric (Cu^{2+}) menjadi cuprous (Cu^{+}) dengan memberikan elektron kepada senyawa antioksidan (Sunitha, 2016).

Aktivitas antioksidan diidentifikasi secara kualitatif dengan melihat ada atau tidaknya perubahan warna kuning kecoklatan. Hasil reaksi reduksi ion Cu^{2+} dapat diamati pada panjang gelombang 450 nm (Maryam dkk., 2016).

5. Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

Pemeriksaan aktivitas antioksidan dengan metode ORAC ini berprinsip pada pengukuran kemampuan aktivitas antioksidan dengan memberikan hidrogen untuk mengurangi efek radikal peroksil yang dilihat dari penurunan intensitas molekul fluoresen selama reaksi berlangsung. Mekanisme kerja dari pengujian ini adalah adalah inhibitor azida/AAPH yang bertindak sebagai prosen radikal peroksil dengan oksidasi akan bereaksi dengan molekul fluoresensi seperti fluorescein atau β -pikokeritrin dan menyebabkan hilangnya kemampuan berfluoresensi sebagai interpretasi dari kemampuan peredaman senyawa antioksidan terhadap radikal bebas. Intensitas fluorosen akan mengalami penurunan akibat dari keberlangsungan proses degenasi oksidatif sebagai penanda dekomposisi fluorosis yang akan direkam dalam rentan waktu 30 menit setelah dilakukan penambahan APPH, penurunan intensitas warna akan diamati pada panjang gelombang 520 nm pada fase emisi dan 480 nm pada fase eksitasi (Aryanti, Perdana dan Mahendra, 2021)