

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radikal Bebas dan Stres Oksidatif

Radikal bebas adalah suatu molekul atau senyawa yang dapat berdiri sendiri dan mengandung satu atau lebih elektron yang tak berpasangan. Agar elektronnya berpasangan, radikal bebas akan mencari dan mengambil elektron dari molekul lain. Apabila terbentuk radikal bebas yang baru, maka siklus ini akan terus berulang hingga radikal bebas tersebut memiliki elektron yang berpasangan kembali (Tanzil, 2013:78). Menurut Romatussolihat (2015), radikal bebas dapat mengambil elektron dari senyawa-senyawa seperti asam nukleat, protein, lemak, bahkan DNA sel dan dapat menjadi penyebab munculnya penyakit degeneratif.

Radikal bebas dapat diproduksi secara alami oleh tubuh baik melalui proses metabolisme, peradangan (inflamasi), kekurangan gizi, dan dapat juga disebabkan oleh faktor eksternal yaitu respon tubuh terhadap pengaruh dari luar seperti polusi udara, sinar UV dan asap rokok (Sari, 2017:107). Apabila produksi radikal bebas dalam jumlah abnormal, maka dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif (Sinaga, 2016:176).

Stres oksidatif merupakan keadaan yang ditandai dengan terjadinya ketidakseimbangan antara senyawa antioksidan alami di dalam tubuh dan produksi radikal bebas yang berlebihan. Stres oksidatif dapat menyebabkan berkurangnya kemampuan darah dalam mengantarkan oksigen sehingga dapat menyebabkan apoptosis (kematian) sel (Khairun dan Desty, 2018:412-413). Secara kumulatif stres oksidatif menjadi penyebab berbagai penyakit seperti gangguan pada pembuluh darah (hipertensi, iskemia, kardiomiopati), penyakit pada mata (katarak), saraf (alzheimer, parkinson), paru-paru (asma dan bronkitis), sendi (rematik dan radang), multi organ (kanker, penuaan, diabetes, inflamasi dan infeksi), ginjal (glomerulonefritis dan gagal ginjal) dan gangguan pada janin (preeklamsia) (Labola dan Puspita, 2017:15).

B. Antioksidan

Salah satu senyawa yang sangat diperlukan untuk menghambat radikal bebas dan mencegah terjadinya stres oksidatif tersebut adalah antioksidan. Dalam pengertian kimia, antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron yang bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat sebagai oksidan sehingga aktivitasnya dapat dihambat (Malanggi, Sangi, Paendong, 2012:6). Berdasarkan sumbernya, antioksidan terbagi menjadi 2 golongan yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen diproduksi secara alami di dalam tubuh, contohnya superoksida dismutase (SOD), katalase dan glutathion peroksidase (GPx). Sedangkan antioksidan eksogen diperoleh melalui asupan makanan maupun suplemen, contohnya alfa tokoferol (vitamin E), beta karoten (pro vitamin A) dan asam askorbat (vitamin C) (Maharani; dkk, 2021:393).

Antioksidan yang biasa digunakan oleh manusia ada dua macam, yaitu antioksidan sintetis (buatan) dan antioksidan alami. Antioksidan sintetis biasanya banyak digunakan oleh industri pangan dan makanan, yang paling sering digunakan yaitu BHA (*Butylated Hydroxyl Anisole*), BHT (*Butylated Hydroxytoluene*) dan propil galat (Sari, 2017:108). Jika dilihat berdasarkan batas asupan harian yang ditetapkan oleh BPOM, batas penggunaan BHA adalah 0–0,5 mg/kg berat badan, sedangkan batas penggunaan BHT perhari adalah 0–0,3 mg/kg berat badan (BPOM RI, 2019:159-160). Jika penggunaan antioksidan sintetis melebihi batas asupan yang telah ditetapkan, dapat menyebabkan keracunan dan bersifat karsinogenik (Wulansari, 2018:421). Untuk menghindari efek buruk dari penggunaan antioksidan sintetis, masyarakat harus mencari alternatif lain. Salah satu alternatif yang dapat dipilih adalah dengan menggunakan antioksidan alami.

Antioksidan alami biasanya dapat ditemui pada beberapa tumbuhan. Umumnya, antioksidan yang berasal dari tumbuhan adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, tokoferol, kumarin, dan asam-asam organik polifungsional (asam organik dengan dua atau lebih gugus fungsional) (Fitri, 2014:42). Penggunaan antioksidan alami mampu melindungi tubuh dari aktivitas radikal bebas yang

relatif aman tanpa menimbulkan efek samping, dapat menghambat ataupun mengurangi kemungkinan terjadinya penyakit degeneratif (Adnyani, Parwata, Negara, 2017:163).

Sistem antioksidan dalam tubuh manusia terbagi menjadi 3 golongan, diantaranya (Risma, 2022:7):

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer yaitu antioksidan yang fungsinya mencegah pembentukan radikal bebas selanjutnya (propagasi), contoh dari antioksidan ini adalah vitamin A, fenolat, flavonoid, katekin, kuersetin dan albumin.

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder yaitu antioksidan yang fungsinya menangkap radikal bebas dan menghentikan pembentukannya, contoh dari antioksidan sekunder yaitu *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathion Peroxidase* (GPx) dan katalase.

3. Antioksidan Tersier/*Repair Enzyme*

Antioksidan tersier yaitu antioksidan yang berfungsi memperbaiki jaringan tubuh yang sudah rusak akibat aktivitas radikal bebas, contoh antioksidan tersier yaitu metionin sulfosida reduktase, *DNA repair enzyme*, protease, transferase, dan lipase.

C. Tanaman Obat

Tanaman obat adalah tanaman yang sebagian atau seluruh bagiannya digunakan sebagai bahan obat maupun ramuan. Tujuan penggunaan tanaman obat yaitu sebagai antisipasi untuk mencegah atau mengatasi penyakit secara mandiri, masyarakat biasanya menanam beberapa tanaman obat di halaman rumah atau pekarangan (Nugraha, 2015:59). Di Indonesia, penggunaan tanaman obat dalam mengatasi berbagai penyakit sudah digunakan secara turun-temurun karena dinilai lebih aman dan memiliki efek samping yang relatif lebih kecil dibanding dengan penggunaan obat modern (Sumayyah dan Salsabila, 2017:2).

D. Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl)

Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) merupakan salah satu tanaman yang tergolong dalam famili *Piperaceae*. Cabai Jawa memiliki sebutan yang berbeda-beda di beberapa negara diantaranya Indonesia: cabe bali, jabe jamu, lada panjang, cabean, campli puta, cabe sula; Vietnam: *tat bat*, *tat phat*; Malay: *chabai jawa*, *kadawak*, *bakek*; Filipina: *litlit*; Thai: *phrik-hang*, *di pli*, *dipli chuak*; China: *bi ba*; English: *long pepper*, *balin* (Plantamor, 2022).

1. Klasifikasi Tanaman Cabai Jawa

Tanaman Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) diklasifikan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
 Divisi : Magnoliophyta
 Kelas : Magnoliopsida
 Ordo : Piperales
 Famili : Piperaceae
 Genus : Piper
 Spesies : *Piper retrofractum* Vahl.



Sumber: Dokumentasi pribadi

Gambar 2.1 Tanaman Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl).

2. Morfologi tanaman Cabai Jawa

Tanaman Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) merupakan tumbuhan dengan batang memanjat, melilit atau melata. Daun berbentuk bundar telur sampai lonjong, pangkal daun berbentuk jantung atau membulat, ujung daun runcing, bintik-bintik kelenjar terdapat di permukaan bawah; panjang helai daun 8,5 cm sampai 30 cm, lebar helai daun 3 cm sampai 13 cm,

panjang tangkai daun 0,5 cm sampai 3 cm. Perbungaan berupa bulir yang tegak atau sedikit merunduk, bergagang 0,5 cm sampai 2 cm, daun gagang (*bractea*) berbentuk bundar telur, panjang 1,5 mm sampai 2 mm, berwarna kuning waktu antesis, melekat pada gagang hanya pada satu titik saja; bulir jantan, panjang 2,5 sampai 8,5 cm; benang sari 2 kadang-kadang 3, pendek; bulir betina, panjang 1,5 cm sampai 3 cm; putik berjumlah 2 sampai 3 buah. Buah berbentuk bulat, berwarna merah cerah, biji berukuran 2 mm sampai 2,5 mm (Depkes RI, 1995).

3. Khasiat

Tanaman Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) memiliki beberapa manfaat untuk kesehatan diantaranya sebagai analgetik, karminatif, antioksidan, antimikroba, afrodisiak, diaforetik, hematinik, antibakteri, aktivitas depresan, antelmintik, sedatif, anti-obesitas, anti malaria, antikanker, antidiabetes, dan merangsang aktivitas organ reproduksi laki-laki (Evizal, 2013:38).

4. Kandungan

Menurut Muhlisah (2004:14) dalam buku “Taman Obat Keluarga”, buah Cabai Jawa (*Piper retrofractum* Vahl) mengandung senyawa piperine, asam palmitat, asam tetrahidropiperik, 1-undecylenyl-3, 4-methylenedioxybenzene, piperidine, minyak atsiri, n-isobutildecatrans-2-trans4-dienamide, dan sesamin. Adapun senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam buah Cabai Jawa antara lain alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan glikosida (Sanjaya, Riyanta, Santoso, 2021:60). Berdasarkan hasil penelitian Safitri dan Syafitri (2022), metabolit sekunder yang terkandung dalam buah Cabai Jawa yaitu flavonoid, steroid, dan alkaloid. Selain itu, buah Cabai Jawa juga mengandung senyawa terpenoid yang dapat berperan sebagai antioksidan alami (Yuliatmoko dan Febria, 2018:227).

Berdasarkan uraian mengenai kandungan buah cabai jawa di atas, zat yang berperan sebagai antioksidan alami diantaranya yaitu piperin, golongan fenol, flavonoid (Wulandari, 2020:8-10), terpenoid (Yuliatmoko dan Febria, 2018:227), Saponin (Novitasari dan Putri, 2016:11), dan alkaloid (Mu'awwanah dan Ulfah, 2017:118).

E. Ekstraksi

Menurut Marjoni (2016) dalam bukunya yang berjudul “Dasar-dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi”, ekstraksi adalah proses penyarian zat aktif dari suatu bahan alam menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi bertujuan untuk menarik semua zat aktif dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Proses terjadinya ekstraksi dimulai dari pelarut akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut pada bagian luar sel dan selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses tersebut akan terus berulang sampai konsentrasi zat aktif di dalam sel seimbang dengan konsentrasi zat aktif di luar sel.

Menurut Marjoni (2016:18) dan Hanani (2015:11), ada beberapa faktor yang harus diperhatikan dalam melakukan ekstraksi yaitu:

1. Jumlah simplisia yang akan diekstrak
2. Derajat kehalusan simplisia
3. Jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi
4. Waktu ekstraksi
5. Metode ekstraksi
6. Kondisi proses ekstraksi
7. Suhu dan tekanan

Ekstraksi simplisia dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu ekstraksi cara dingin dan ekstraksi cara panas. Pemilihan metode ekstraksi harus dilakukan dengan memperhatikan sifat senyawa, pelarut yang digunakan, dan alat ekstraksi yang tersedia (Hanani, 2015:11). Berikut adalah beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan:

1. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi dengan merendam simplisia dalam pelarut pada suhu kamar sehingga dapat meminimalisir kerusakan kandungan metabolit dalam sampel yang tidak tahan terhadap pemanasan (Hanani, 2015:11). Maserasi biasanya dilakukan selama 3-5 hari dengan perbandingan analit-pelarut yaitu 1:7. Selama proses perendaman, bahan yang diekstraksi harus diaduk secara berulang. Hal ini bertujuan untuk menjamin

keseimbangan konsentrasi bahan ekstraksi lebih cepat dalam cairan. Tanpa adanya pengadukan akan mengakibatkan berkurangnya perpindahan bahan aktif selama proses maserasi (Marjoni, 2016:41).

Tabel 2.1 Kelebihan dan kekurangan metode maserasi

Kelebihan	Kekurangan
Peralatan yang digunakan sangat sederhana	Membutuhkan banyak waktu
Teknik pengerjaan relatif sederhana dan mudah	Proses penyarian tidak sempurna, karena zat aktif yang mampu terekstraksi hanya sebesar 50%
Biaya operasional lebih rendah	Pelarut yang digunakan cukup banyak
Metode ini dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil karena tidak dilakukan pemanasan	Kemungkinan besar ada beberapa senyawa yang hilang saat proses ekstraksi
Proses ekstraksi lebih hemat penyari	Beberapa senyawa sulit diekstraksi pada suhu kamar
	Jika menggunakan pelarut air, membutuhkan pengawet untuk mencegah pertumbuhan bakteri dan kapang

2. Perkolasi

Perkolasi adalah cara ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang selalu baru, dengan mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa tersari sempurna. Kelemahan metode ini adalah waktu yang dibutuhkan lebih lama dan jumlah pelarut yang dibutuhkan lebih banyak (Hanani, 2015:11).

3. Refluks

Refluks adalah salah satu ekstraksi cara panas, ekstraksi ini dilakukan dengan pelarut pada suhu didih selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Agar hasil penyarian maksimal, refluks umumnya dilakukan berulang antara 3-6 kali terhadap residu pertama (Hanani, 2015:11).

4. Soxhletasi

Soxhletasi adalah salah satu metode ekstraksi cara panas menggunakan pelarut organik pada suhu didih dengan alat soxhlet. Pada metode ini, simplisia dan ekstrak berada pada labu yang terpisah. Pemanasan yang dilakukan mengakibatkan pelarut menguap, dan uap akan masuk ke dalam

labu pendingin. Hasil kondensasi jatuh ke bagian simplisia sehingga ekstraksi berlangsung terus-menerus dengan jumlah pelarut yang relatif konstan. Ekstraksi ini juga dikenal sebagai ekstraksi sinambung (Hanani, 2015:11).

Tabel 2.2 Kelebihan dan kekurangan metode soxhletasi

Kelebihan	Kekurangan
Metode ini dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan langsung	Tidak baik digunakan untuk bahan-bahan tumbuhan yang mudah rusak dengan adanya pemanasan
Sampel dapat diekstraksi secara sempurna karena dilakukan secara berulang	Terjadinya reaksi penguraian, karena ekstrak yang sudah terkumpul dalam labu akan terus-menerus dipanaskan
Pelarut yang dibutuhkan lebih sedikit	Pelarut yang digunakan mempunyai titik didih rendah, sehingga mudah menguap
Pelarut yang digunakan tidak habis, karena dapat digunakan lagi setelah hasil isolasi dipisahkan	Jumlah total senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut tertentu sehingga akan mengendap dalam wadah
Waktu yang digunakan lebih efisien karena prosesnya cepat	Metode ini terbatas pada pelarut campuran, karena uap pelarut mempunyai komposisi yang berbeda dalam pelarut cair
Pelarut organik dapat mengambil senyawa organik berulang kali	

5. Infusa

Infusa termasuk ke dalam salah satu jenis ekstraksi dengan cara panas. Pada metode ini, pelarut yang digunakan adalah air, pada suhu 96-98 °C selama 15-20 menit (terhitung setelah mencapai suhu 96 °C). Bejana infusa yang berisi sampel tercelup dalam penangas air. Metode ini cocok untuk ekstraksi simplisia yang bersifat lunak, misalnya bunga dan daun (Hanani, 2015:13).

6. Dekokta

Prinsip kerja dekokta hampir sama dengan infusa, hanya saja terdapat perbedaan lama waktu ekstraksi. Pada metode ini waktu yang dibutuhkan sekitar 30 menit dan suhunya mencapai titik didih air (Hanani, 2015:13).

7. Destilasi (penyulingan)

Destilasi yaitu salah satu metode ekstraksi dengan cara panas, prinsip kerja metode ini yaitu menarik atau menyari senyawa yang ikut menguap bersama air sebagai pelarutnya. Biasanya metode ini digunakan untuk mengisolasi minyak atsiri pada tanaman (Hanani, 2015:13).

8. Lawan arah (*counter current*)

Metode ini serupa dengan perkolasi, tetapi simplisia bergerak berlawanan arah dengan pelarut yang digunakan. Cara ini banyak dimanfaatkan untuk ekstraksi bahan herbal dalam skala besar (Hanani, 2015:13).

9. Ultrasonik

Metode ini melibatkan penggunaan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-2000 kHz sehingga permeabilitas dinding sel meningkat dan isi sel keluar. Frekuensi getaran yang dihasilkan akan mempengaruhi hasil ekstraksi (Hanani, 2015:13).

10. Gelombang Mikro (*microwave assisted extraction, MAE*)

Metode ini menggunakan gelombang mikro (2450 MHz) merupakan ekstraksi yang selektif dan digunakan untuk senyawa yang memiliki dipol/*dipole* polar. Kelebihan dari metode ini jika dibanding metode konvensional seperti maserasi adalah lebih menghemat waktu dan pelarut (Hanani, 2015:13).

11. Ekstraksi gas superkritis (*supercritical gas extraction, SGE*)

Metode ini menggunakan CO₂ dengan tekanan tinggi, dan banyak digunakan untuk ekstraksi minyak atsiri atau senyawa yang bersifat mudah menguap atau termolabil. Penggunaan karbondioksida (CO₂) lebih disukai karena bersifat *inert*, toksisitasnya rendah, aman bagi lingkungan, harga relatif mudah, dan tidak mudah terbakar pada kondisi superkritisnya (Hanani, 2015:13).

F. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit sekunder merupakan suatu senyawa yang proses sintesis dan pembentukannya hanya ada pada spesies tertentu. Disebut metabolit sekunder karena senyawa tersebut tidak memiliki peran secara langsung dalam kelangsungan hidup dan eksistensi suatu individu. Meskipun begitu, pada spesies tertentu metabolit sekunder seringkali berperan sebagai alat pertahanan diri dan zat penarik bagi spesies lain (Endarini, 2016:114).

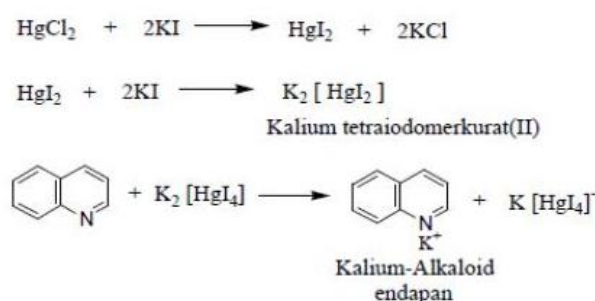
Berdasarkan kerangka dasar senyawanya, metabolit sekunder dikelompokkan menjadi golongan alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, maupun saponin (Saidi; dkk, 2018:12).

1. Alkaloid

Alkaloid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang mengandung unsur nitrogen (N) pada cincin heterosiklik dan bersifat basa. Alkaloid pada umumnya berbetuk padatan dan berwarna putih, tetapi ada juga yang berbentuk cair (nikotin) dan ada juga yang berwarna kuning (berberin dan serpentin) (Hanani, 2015:133).

Secara alami, biasanya alkaloid disimpan di dalam biji, batang, daun, buah ataupun organ lain pada tumbuhan. Senyawa alkaloid dapat tersedia dalam bentuk bebas/bentuk basa atau bisa juga dalam bentuk garamnya. Senyawa alkaloid yang tersedia dalam bentuk bebas akan mudah larut dalam pelarut organik (kloroform, eter), sedangkan yang tersedia dalam bentuk garamnya akan mudah larut dalam air (Endarini, 2016:92-93).

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan mereaksikan larutan sampel dengan 3 pereaksi yaitu pereaksi mayer, *bouchardat*, dan *dragendrof*. Hasil positif dari reaksi antara sampel dan pereaksi ditunjukkan dengan terbentuknya endapan. Hasil positif jika direaksikan dengan pereaksi mayer adalah dengan terbentuknya endapan putih kekuningan. Senyawa alkaloid yang berinteraksi dengan ion tetraiodomerkurat (II) akan menghasilkan senyawa yang kompleks dan menghasilkan endapan (Sulistyarini, Sari, Wicaksono, 2020:59).

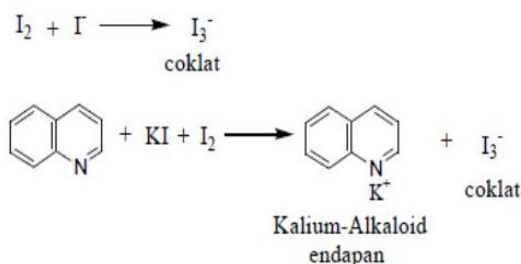


Sumber: Illing, Safitri, Erfiana, 2017: 80

Gambar 2.2 Reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi mayer.

Reaksi yang terjadi pada penambahan pereaksi *bouchardat*, hasil positif akan menunjukkan terbentuknya endapan berwarna coklat muda hingga merah (Illing, Safitri, Erfiana, 2017:80). Terbentuknya endapan tersebut

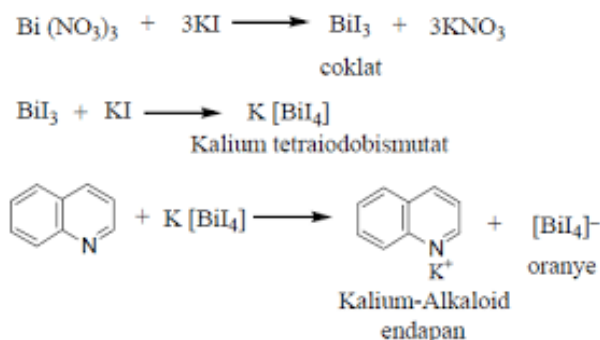
karena adanya ikatan kovalen antara ion logam K^+ dengan senyawa alkaloid sehingga terbentuk kalium-alkaloid yang mengendap (Nafisah; dkk, 2004 dalam Sulistyarini, Sari, Wicaksono, 2020:59).



Sumber: Illing, Safitri, Erfiana, 2017: 80

Gambar 2.3 Reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi *bouchardat*.

Penambahan pereaksi *dragendorf* pada identifikasi senyawa alkaloid akan menghasilkan endapan berwarna jingga/merah bata. Pereaksi *dragendorf* terdiri dari bismut nitrat dan kalium iodida dalam larutan asam asetat glasial/kalium tetraiodobismutat (III) (Sangi; dkk, 2019: 48 dan 51).



Sumber: Setyowati; dkk, 2014:275

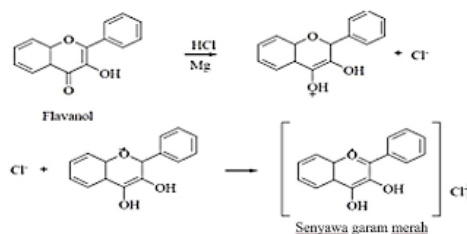
Gambar 2.4 Reaksi senyawa alkaloid dengan pereaksi *dragendorf*.

2. Flavonoid

Flavonoid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat di tumbuhan. Flavonoid memiliki struktur inti $C_6-C_3-C_6$ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Umumnya flavonoid ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang menyebabkan senyawa ini lebih mudah larut dalam pelarut polar, seperti metanol, etanol, butanol, dan etil asetat (Hanani, 2015:103).

Flavonoid pada tumbuhan biasanya merupakan pigmen berwarna sehingga dapat menarik serangga dan membantu proses penyerbukan atau dapat menarik binatang lain misalnya burung untuk membantu penyebaran biji. Sedangkan bagi kesehatan, flavon dapat bekerja sebagai stimulan pada jantung. Flavon terhidroksilasi memiliki efek diuretik, dan sebagai antioksidan pada lemak. Beberapa kelompok isoflavon juga menunjukkan aktivitas mengurangi atau menurunkan kadar kolesterol serum (Hanani, 2015:106).

Uji identifikasi flavonoid menunjukkan hasil positif jika terbentuk warna merah, kuning, dan jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016:10). Pada saat penambahan serbuk Mg dan HCl_(P) pada ekstrak tumbuhan yang mengandung flavonoid, maka akan terbentuk garam flavilium yang berwarna merah atau jingga (Setyowati; dkk, 2014:275).



Sumber: Setyowati; dkk, 2014:275

Gambar 2.5 Mekanisme terbentuknya garam flavilium berwarna merah.

3. Tanin

Tanin adalah suatu senyawa polifenol yang terkandung di dalam tumbuhan, biasanya terdapat pada jaringan kayu misalnya kulit batang dan jaringan lain seperti daun dan buah. Tanin berbentuk amorf yang mengakibatkan terjadinya koloid dalam air, memiliki rasa yang sepat, dapat bereaksi dengan protein dan membentuk endapan yang menghambat kerja enzim proteolitik (Hanani, 2015:79).

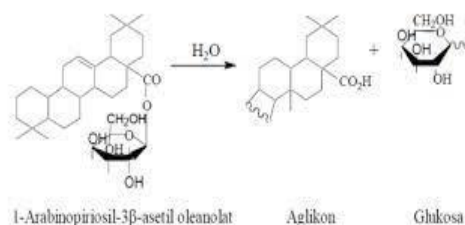
Berdasarkan sifat dan strukturnya, tanin diklasifikasikan menjadi dua golongan yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis penyebarannya terbatas yaitu hanya pada tanaman berkeping dua. Sedangkan tanin terkondensasi penyebarannya banyak ditemui pada tanaman paku-pakuan, gymnospermae dan angiospermae terutama pada jenis tanaman berkayu (Endarini, 2016:133).

Identifikasi senyawa tanin pada tumbuhan adalah dengan menambahkan pereaksi FeCl_3 pada ekstrak yang telah diencerkan. Hasil positif suatu sampel mengandung tanin adalah dengan terbentuknya larutan warna biru atau hijau kehitaman (Marjoni, 2016:10). Terbentuknya warna hijau kehitaman pada larutan sampel, karena tanin yang terdapat di dalam ekstrak akan bereaksi dengan Fe^{3+} sehingga membentuk senyawa kompleks (Setyowati; dkk, 2014:276).

4. Saponin

Kata “saponin” diambil dari nama tanaman *Saponaria vaccaria*, yaitu tanaman yang dapat digunakan sebagai sabun dan ternyata tanaman tersebut mengandung saponin. Saponin dapat larut dalam air, tidak larut dalam eter dan jika terhidrolisis akan menghasilkan aglikon. Saponin memiliki bobot molekul tinggi, tersebar dalam beberapa tumbuhan, merupakan bentuk glikosida dengan molekul gula yang terikat dengan aglikon triterpen atau steroid (Hanani, 2015:227).

Identifikasi senyawa saponin yang terkandung dalam tanaman, dapat dilihat dengan terbentuknya buih atau busa yang tetap bertahan setelah penambahan larutan HCl 2N pada larutan ekstrak (Marjoni, 2016:12). Timbulnya buih tersebut disebabkan oleh adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Setyowati; dkk, 2014:276).



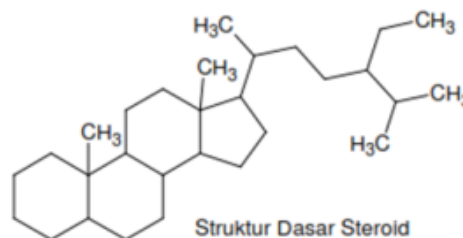
Sumber: Illing, Safitri, Erfiana, 2017:81

Gambar 2.6 Reaksi hidrolisis saponin dalam air.

5. Steroid/Triterpenoid

Steroid adalah kelompok senyawa bahan alam yang kebanyakan strukturnya terdiri atas 17 karbon dengan membentuk struktur 1,2-siklopentenoperhidrofenantren. Steroid pada tumbuhan disebut sterol karena

berupa alkohol dengan gugus hidroksil pada posisi C-3. Secara biogenetik, steroid yang terdapat di alam berasal dari golongan triterpen yaitu sikloartenol pada jaringan tumbuhan dan lanostrenol pada jaringan hewan. (Endarini, 2016:116).



Sumber: Illing, Safitri, Erfiana, 2017:74

Gambar 2.7 Struktur dasar steroid.

Triterpenoid merupakan senyawa golongan terpenoid dengan 30 rantai karbon. Triterpenoid banyak ditemukan dalam bentuk glikosida, sehingga akan mudah diekstraksi menggunakan pelarut polar dari golongan alkohol seperti metanol (Septiandari, 2016:2). Triterpenoid memiliki struktur siklik pigmen karotenoid yang relatif rumit. Triterpenoid banyak ditemui berupa alkohol atau asam karboksilat yang tidak berwarna dan berbentuk kristal (Radam dan Purnamasari, 2016:32).

Identifikasi steroid/triterpenoid dapat dilakukan dengan menambahkan asam asetat anhidrat dan H₂SO_{4(P)} pada sisa residu sampel yang telah dimaserasi menggunakan n-heksan. Hasil positif steroid apabila terbentuk warna biru atau hijau, sedangkan hasil positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau ungu (Marjoni, 2016:12-13).

G. Metode Pengukuran Aktivitas Antioksidan

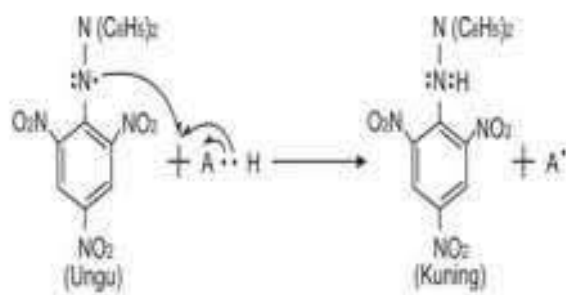
Pengujian aktivitas antioksidan pada tanaman dapat menggunakan beberapa metode berikut:

1. Metode DPPH (*2,2 dipenyl-1-picrylhidrazyl*)

Metode DPPH memberikan informasi tentang reaktifitas suatu senyawa yang diuji dengan radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 515-520 nm dengan warna violet gelap. Prinsip dari pengukuran antioksidan dengan menggunakan metode ini adalah dengan

mengukur pemudaran warna ungu menjadi warna kuning yang terjadi pada larutan DPPH akibat adanya antioksidan yang menetralkan molekul radikal bebas (Wulan, Yudistira, Rotinsulu, 2019:111).

Metode DPPH sering digunakan karena memiliki beberapa kelebihan, diantaranya karena metode ini sederhana, mudah dan cepat dilakukan, peka dan memerlukan lebih sedikit sampel. Selain membutuhkan senyawa DPPH yang stabil, metode ini juga membutuhkan senyawa pembanding seperti vitamin A, vitamin C dan vitamin E (Julizan, 2019:42).



Sumber: Haeria, Tahar, Munadiah, 2018:94

Gambar 2.8 Reaksi peredaman DPPH oleh antioksidan.

Penentuan aktivitas antioksidan adalah dengan menghitung persentase peredaman antioksidan terhadap radikal bebas. Nilai persentase peredaman yang diperoleh, selanjutnya ditentukan harga peredaman efektif lima puluh persennya atau dikenal sebagai *inhibitory concentration 50* (IC_{50}). Nilai IC_{50} merupakan nilai konsentrasi senyawa antioksidan yang mampu meredam aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak 50%, semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidannya (Nurhasnawati, Sukarni, Handayani, 2017:93-94).

Tabel 2.3 Kategori kekuatan aktivitas antioksidan (Mulia, Hasan, Suryani, 2016:87)

No	Kategori	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
1	Sangat kuat	<50
2	Kuat	50 – 100
3	Sedang	101 – 250
4	Lemah	250 – 500
5	Tidak aktif	> 50

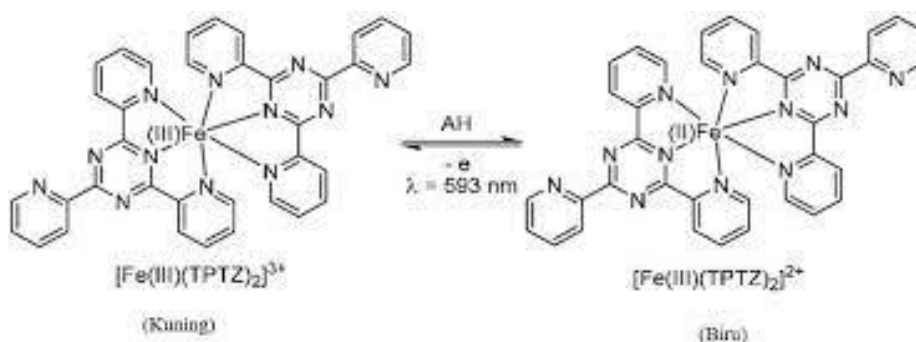
2. ABTS (2,2'-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]- diammonium salt)

ABTS merupakan salah satu senyawa radikal kation organik yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bereaksi pada pH 7,4 berdasarkan waktu dan perubahan warna. Aktivitasnya ditandai dengan perubahan warna yang awalnya biru hijau menjadi tidak berwarna (Risma, 2022:10).

Prinsip pengujian menggunakan metode ABTS adalah dengan menghilangnya warna kation ABTS untuk mengukur aktivitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan kation ABTS. Salah satu kelemahan metode ini yaitu ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, jadi dalam proses inkubasi membutuhkan waktu sekitar 12-16 jam dalam kondisi gelap (Setiawan, Yunita, Kurniawan, 2018:85).

3. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FRAP merupakan suatu metode analisis dalam uji aktivitas antioksidan yang biasa digunakan untuk mengukur kekuatan antioksidan dalam mereduksi Fe^{3+} -TPTZ menjadi Fe^{2+} -TPTZ yang awalnya berwarna kuning menjadi warna biru (Risma, 2022:13). Kelebihan metode ini adalah cukup sederhana, reagen yang dibutuhkan mudah disiapkan, serta metode ini tidak membutuhkan biaya yang mahal (Fikey, 2020:3).



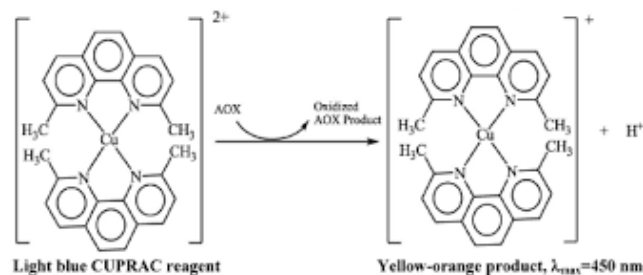
Sumber: Haeria, Tahar, Munadiah, 2018:95

Gambar 2.9 Reaksi reduksi Fe^{3+} oleh antioksidan.

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

Pengujian antioksidan menggunakan metode CUPRAC, kompleks bisneokuproin-tembaga (II) akan mengoksidasi senyawa antioksidan yang terdapat dalam ekstrak tanaman dan mengalami reduksi membentuk

kompleks bisneokuproin-tembaga (I). Hal ini dapat dilihat secara visual karena adanya perubahan larutan yang awalnya berwarna biru menjadi berwarna kuning (Haeria, Tahar, Munadiah, 2018:95).



Sumber: Haeria, Tahar, Munadiah, 2018:95

Gambar 2.10 Reaksi metode CUPRAC.

H. Persen Inhibisi dan Nilai IC₅₀

Aktivitas antioksidan suatu sampel dinyatakan dalam nilai persen inhibisi dan hasil akhir berupa nilai IC₅₀. Persen inhibisi merupakan kemampuan suatu bahan dalam menghambat aktivitas radikal bebas yang berhubungan dengan masing-masing konsentrasi larutan uji. Persen inhibisi dapat diperoleh dari pembacaan nilai absorbansi larutan uji pada panjang gelombang maksimum larutan kontrol DPPH menggunakan *spektrofotometer visible*. Setelah memperoleh absorbansi masing-masing sampel, persen inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

- Absorbansi kontrol = absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum (517 nm)
- Absorbansi sampel = absorbansi larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum (517 nm)

Hasil akhir penentuan aktivitas antioksidan pada suatu sampel akan dinyatakan dalam nilai IC₅₀ yaitu nilai yang menunjukkan besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%. Nilai IC₅₀ dapat diperoleh setelah membuat persamaan garis yang

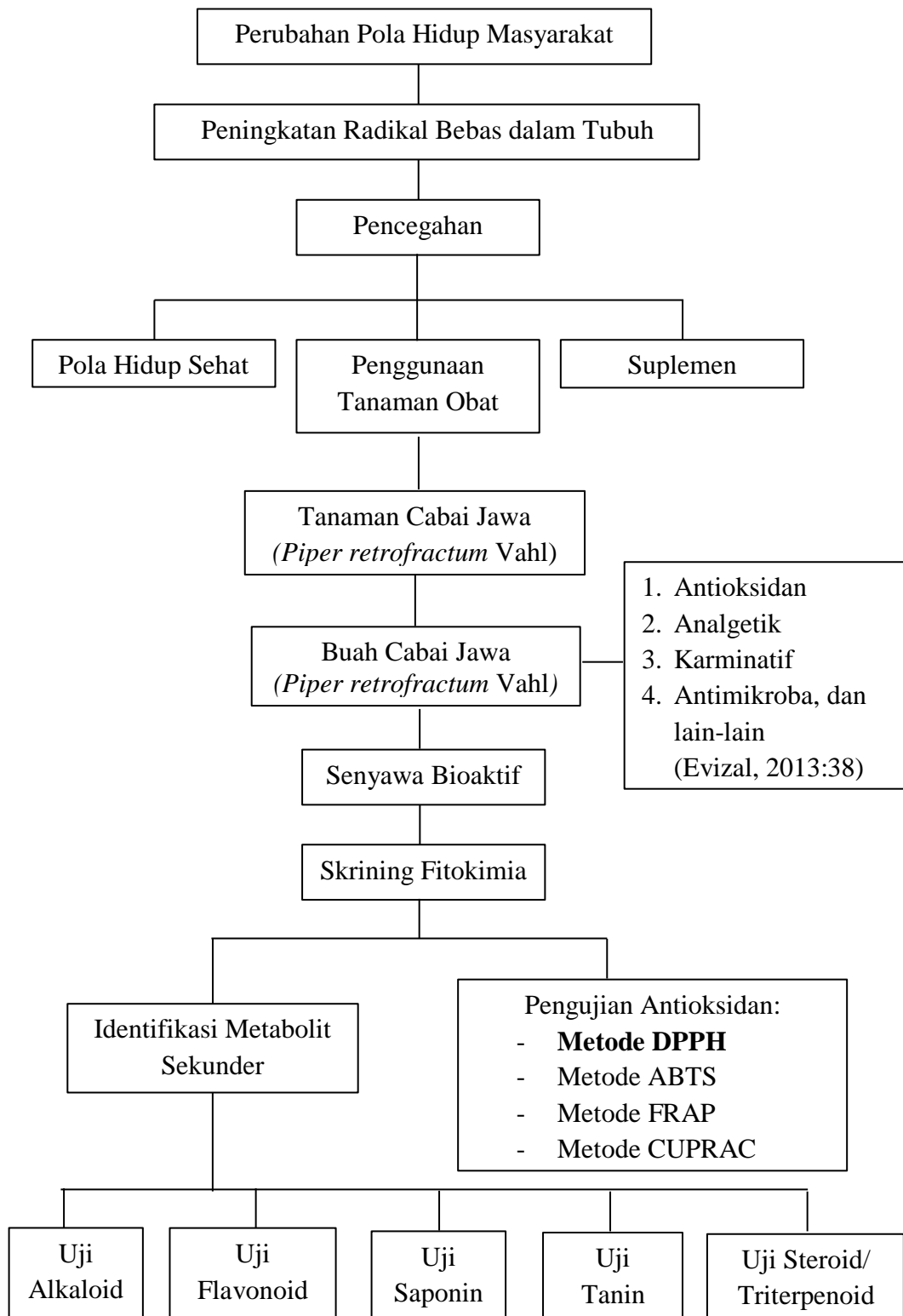
menghubungkan antara nilai persen inhibisi terhadap berbagai konsentrasi larutan uji maupun larutan pembanding (kuersetin). Nilai IC_{50} dapat dihitung berdasarkan persamaan garis regresi linear korelasi antara I dengan K menggunakan rumus sebagai berikut:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

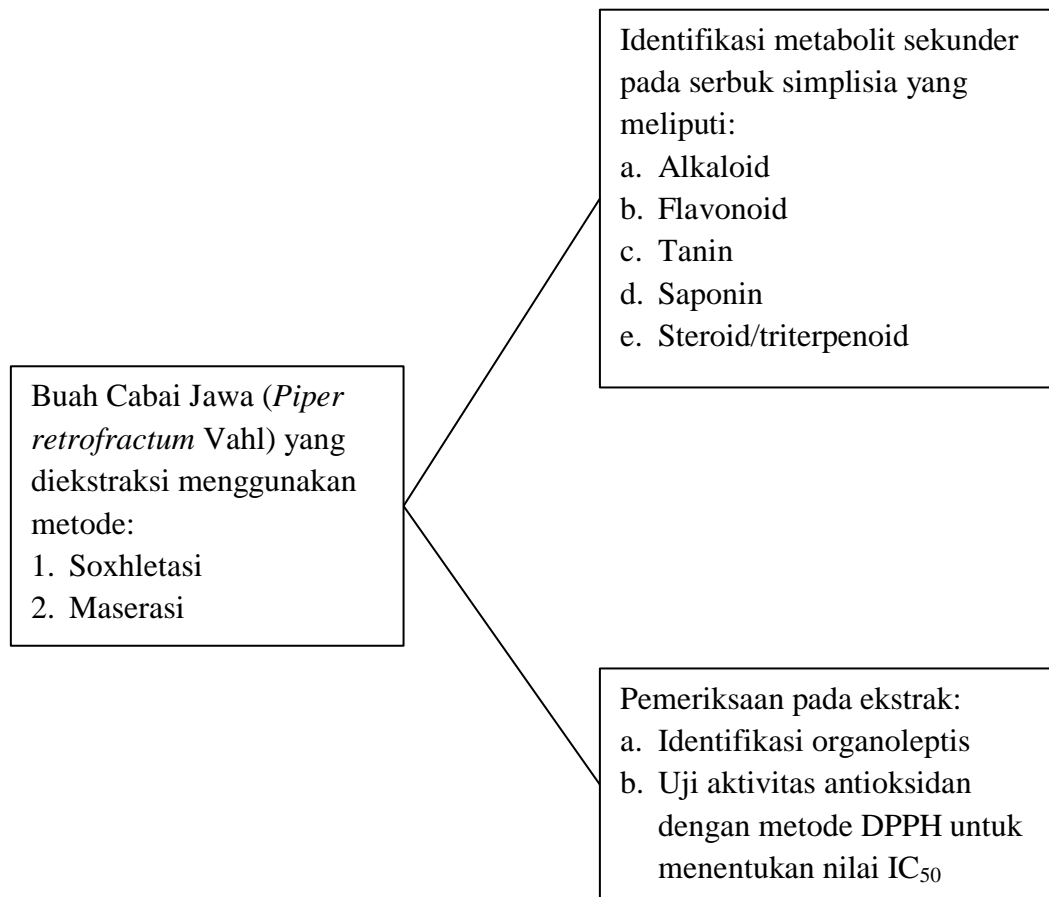
- $y = 50$
- $x =$ konsentrasi larutan uji (K)

I. Kerangka Teori



Gambar 2.11 Kerangka Teori.

J. Kerangka Konsep



Gambar 2.12 Kerangka Konsep.

K. Definisi Operasional

Tabel 2.4 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Profil Metabolit Sekunder					
Senyawa alkaloid	Senyawa yang teridentifikasi jika terbentuk endapan setelah direaksikan dengan pereaksi <i>dragendorf</i> , <i>bauchardat</i> , dan mayer (Marjoni, 2016).	Observasi	Visualisasi dengan mata	(+) terbentuk endapan pada sampel yang telah direaksikan dengan reagen (minimal dua sampel yang menghasilkan endapan) (-) tidak terbentuk endapan pada ketiga sampel yang direaksikan dengan ketiga reagen	Nominal
Senyawa flavonoid	Senyawa yang teridentifikasi apabila terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol pada uji flavonoid (Marjoni, 2016).	Observasi	Visualisasi dengan mata	(+) terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (-) tidak terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol	Nominal
Senyawa saponin	Senyawa yang teridentifikasi	Observasi	Visualisasi dengan	(+) terbentuk buih pada saat	Nominal

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
	apabila terbentuk buih pada saat penambahan larutan HCl 2N (Marjoni, 2016).		mata	penambahan larutan HCl 2N (-) tidak terbentuk buih pada saat penambahan larutan HCl 2N	
Senyawa tanin	Senyawa yang teridentifikasi apabila terbentuk warna biru atau hijau kehitaman saat penambahan pereaksi FeCl ₃ (Marjoni, 2016).	Observasi	Visualisasi dengan mata	(+) terbentuk warna biru atau hijau kehitaman saat penambahan pereaksi FeCl ₃ (-) tidak terbentuk warna biru atau hijau kehitaman saat penambahan pereaksi FeCl ₃	Nominal
Senyawa steroid/ triterpenoid	Senyawa yang teridentifikasi apabila terbentuk warna biru hingga hijau yang menunjukkan positif mengandung steroid atau terbentuk warna merah hingga ungu yang	Observasi	Visualisasi dengan mata	(+) terbentuk warna biru hingga hijau atau merah hingga ungu (-) tidak terbentuk warna biru hingga hijau atau merah hingga ungu yang	Nominal

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
	menunjukkan positif mengandung triterpenoid saat direaksikan dengan larutan pereaksi <i>Lieberman Burchard</i> (Marjoni, 2016).				
Identifikasi pada ekstrak					
Sifat organoleptis ekstrak etanol buah Cabai Jawa	Organoleptis ekstrak bertujuan sebagai pengenalan awal yang sederhana dengan mendeskripsikan bentuk, warna, bau dan rasa (Depkes RI, 2000:31).	Observasi	Panca indra	Konsistensi ekstrak, warna, dan bau	Nominal
Aktivitas antioksidan dengan menghitung IC_{50}	Besarnya konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebanyak 50% (Pindan <i>et al</i> , 2021).	Observasi terhadap perubahan warna DPPH, kemudian diamati melalui <i>spektrofotometer Visible</i>	Visualisasi dengan mata dan spektrofotometer	1 = sangat kuat (<50) 2 = kuat (50-100) 3 = sedang (101-150) 4 = lemah (151-200)	Ordinal