

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radikal Bebas dan Stres Oksidatif

Radikal bebas merupakan molekul yang bersifat sangat aktif, ia akan menyerang molekul di sekitarnya, mengambil elektron untuk mendapatkan konfigurasi elektron yang berpasangan sehingga menjadi kurang aktif. Molekul yang kehilangan satu elektron akan menjadi radikal bebas, karena mempunyai elektron yang tidak berpasangan di kulit luarnya. Selanjutnya radikal bebas yang baru terbentuk akan bereaksi dengan molekul sekitarnya, dan siklus tersebut terulang lagi. Dengan cara ini terjadi reaksi berantai molekuler (Tanzil, 2013).

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 (Winarsi, 2007 dalam penelitian 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).

B. Antioksidan

Salah satu senyawa yang sangat diperlukan untuk menghambat radikal bebas, dan mencegah terjadinya stres oksidatif adalah antioksidan. Dalam pengertian kimia, antioksidan merupakan senyawa pemberi *electron*, yang bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat sebagai

oksidan, sehingga aktivitasnya dapat dihambat (Malangngi, Sangi, Paendong, 2012:6).

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 profil galat (Sari, 2017:108).

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 (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).

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

1. Antioksidan Primer

Antioksidan primer, yaitu antioksidan yang fungsinya mencegah pembentukan radikal bebas selanjutnya (propagasi). Contoh dari antioksidan ini adalah transferin, feritin, 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), Glutation 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 Kelor (*Moringa oleifera* L.)



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2. 1 Tanaman Kelor
(*Moringa oleifera* L.)



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2. 2 Daun Tanaman Kelor
(*Moringa oleifera* L.)



Sumber : Dokumentasi Pribadi

Gambar 2. 3 Bunga Tanaman Kelor (*Moringa oleifera* L.)

1. Klasifikasi Tanaman Kelor

Klasifikasi tanaman kelor (*Moringa oleifera* L.) menurut Hutagaol (2018) adalah sebagai berikut :

| | |
|--------------------|------------------------------|
| <i>Kingdom</i> | : <i>Plantae</i> |
| <i>Subkingdom</i> | : <i>Tracheobionta</i> |
| <i>Superdivisi</i> | : <i>Spermathophyta</i> |
| <i>Divisi</i> | : <i>Magnoliophyta</i> |
| <i>Kelas</i> | : <i>Magnoliopsida</i> |
| <i>Subkelas</i> | : <i>Dilleniidae</i> |
| <i>Ordo</i> | : <i>Capparales</i> |
| <i>Famili</i> | : <i>Moringaceae</i> |
| <i>Genus</i> | : <i>Moringa</i> |
| <i>Spesies</i> | : <i>Moringa oleifera</i> L. |

2. Morfologi Tanaman Kelor

a. Deskripsi Tanaman

Kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan tanaman yang dapat ditemukan di daerah tropis dan subtropis. Kelor termasuk dalam famili *Moringaceae* dan merupakan tanaman asli Asia Selatan, terutama di kaki bukit Himalaya, India. Tanaman ini tumbuh dan dinaturalisasi di negara-negara lain seperti Afghanistan, Nepal, Bangladesh, Sri Lanka, Amerika Selatan dan Tengah, Hindia Barat, Filipina dan Kamboja (Olaoye *et al*, 2021). Tanaman kelor memiliki ketinggian 7-11 meter dan tumbuh subur di dataran rendah sampai ketinggian mencapai 700 m di atas permukaan laut. Kelor dapat tumbuh disemua jenis tanah dan tahan terhadap musim kering serta tanaman kelor mudah di budidayakan dan tidak memerlukan perawatan intensif (Isnan dan Muin,2017:63).

Daun kelor berbentuk bulat telur dengan tepi daun rata dan ukurannya kecil-kecil bersusun majemuk dalam satu tangkai. Daun kelor muda bewarna hijau muda dan berubah menjadi hijau tua saat daun sudah tua. Daun muda bentuknya lembut dan lemas sedangkan daun tua agak kaku dan keras. Daun

bewarna hijau tua biasanya digunakan untuk membuat tepung atau *powder* daun kelor. Apabila jarang dikonsumsi maka daun kelor memiliki rasa agak pahit tetapi tidak beracun. Rasa pahit akan hilang jika daun kelor sering dipanen secara berkala untuk dikonsumsi. Untuk kebutuhan konsumsi umumnya digunakan daun yang masih muda demikian pula buahnya (Syarifah,dkk,2015:37)

Tanaman ini memiliki kulit akar berasa dan beraroma tajam serta pedas, bagian dalam berwarna kuning pucat, bergaris halus, tetapi terang dan melintang. Akarnya sendiri tidak keras, bentuk tidak beraturan, permukaan luar kulit agak licin, permukaan dalam agak berserabut, bagian kayu warna cokelat muda, atau krem berserabut, sebagian besar terpisah (Isnain dan Muin, 2017).

Bunga pada kelor muncul di ketiak daun, bertangkai panjang, kelopak berwarna putih agak krem, menebar aroma khas. Warna dari bunga kelor yaitu putih kekuningan yang terkumpul dalam pucuk lembaga di bagian ketiak dan tudung pelepah bunganya berwarna hijau. Bunga kelor berbunga sepanjang tahun dengan aroma yang semerbak (Krisnadi, 2015:10).

Kelor (*Moringa oleifera* L.) berbuah setelah berumur 12-18 bulan biasanya buah kelor disebut dengan polong. Buah atau polong kelor bentuknya segi tiga memanjang, berwarna hijau saat muda dan setelah tua menjadi cokelat. Biji didalam polong berbentuk bulat berwarna cokelat kehitaman ketika polong matang dan kering (Krisnadi,2015:10)

b. Habitat

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan salah satu jenis tanaman tropis yang tumbuh dan berkembang di daerah tropis seperti Indonesia. Tanaman kelor merupakan tanaman perdu dengan ketinggian 7-11 meter dan tumbuh subur mulai dari dataran rendah sampai dengan ketinggian 1.000 mdpl pada semua jenis tanah, kecuali tanah berlempung berat dengan pH tanah netral sampai sedikit asam. Tanaman kelor dapat tahan terhadap musim kering dengan toleransi terhadap kekeringan sampai 6 bulan, serta mudah dibiakkan dan tidak memerlukan perawatan yang intensif (Isnain dan Muin, 2017).

3. Khasiat

Kelor (*Moringa oleifera* L.) merupakan tanaman obat yang berdasarkan penelitian etnobotani telah terbukti dapat mengobati berbagai penyakit seperti diare, diabetes, epilepsi, penyembuhan luka, dan radang sendi. Beberapa aktivitas farmakologis yang dilaporkan dari bagian tanaman *Moringa oleifera* berkhasiat sebagai stimulan jantung dan peredaran darah, antitumor, antipiretik, antiepilepsi, antiinflamasi, antiulser, antidiuretik, antihipertensi, menurunkan kolesterol, antioksidan, antidiabetik, antibakteri, dan antijamur (Yulyuswarni, 2021)

Daun kelor mengandung beberapa komponen yang dapat bermanfaat dalam kesehatan antara lain (Isnain dan Muin, 2017:69)

- a. Menurunkan berat badan, dengan cara memberikan efek kepada tubuh agar merangsang dan melancarkan metabolisme sehingga dapat membakar kalori lebih cepat.
- b. Daun kelor memiliki sifat antidiabetes yang berasal dari kandungan seng yang tinggi seperti mineral yang sangat dibutuhkan untuk memproduksi insulin. Sehingga daun kelor dapat bermanfaat sebagai anti diabetes yang signifikan.
- c. Daun kelor memiliki kandungan vitamin A yang tinggi, sehingga jika kita mengkonsumsinya secara rutin dapat membuat penglihatan menjadi jernih dan menyehatkan mata. Sedangkan untuk pengobatan luar dapat menggunakan rebusan dari daun kelor untuk membasuh mata yang sedang sakit.
- d. Dapat menyehatkan rambut, karena daun kelor dapat membuat pertumbuhan rambut menjadi hidup dan mengkilap yang dikarenakan asupan nutrisi yang lengkap dan tepat.

4. Kandungan

Salah satu bagian dari tanaman kelor yang telah banyak diteliti kandungan gizi dan kegunaannya baik untuk bidang pangan dan kesehatan adalah bagian daun. Di bagian tersebut terdapat metabolit sekunder berupa fenol, flavonoid, tanin, saponin, alkaloid dan triterpenoid (Kurniawan, 2015) serta ragam nutrisi, di antaranya kalsium, besi, protein, vitamin A, C, E, K, B1, B2, B3, dan B6

(Yuliani and Dienina, 2015). Dalam daun kelor juga ditemukan 15 jenis mineral yang terdiri dari mineral makro dan mikro, yaitu Fosfor, Belerang, Kalium, Kalsium, Titanium, Kromium, Mangan, Besi, Nikel, Tembaga, Seng, Molibdenum, Stronsium, Barium, dan Rений (Manggara and Shofi, 2018).

D. Ekstraksi

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, 2017:11). Berikut adalah beberapa metode ekstraksi yang dapat digunakan:

1. Cara dingin
 - a. Maserasi

Maserasi berasal dari kata "macerate" artinya merendam. Sehingga maserasi dapat diartikan sebagai metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati menggunakan pelarut tertentu selama waktu tertentu dengan sesekali diaduk (Marjoni, 2016: 40).

Maserasi biasanya dilakukan pada suhu antara 15°C-20°C dalam waktu selama 3 hari sampai zat aktif yang dikehendaki larut. Kecuali dinyatakan lain, maserasi dilakukan dengan cara merendam 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat kehalusan tertentu ke dalam sebuah bejana, lalu tuangi dengan 70 bagian cairan penyari yang cocok, tutup dan biarkan selama 3-5 hari pada tempat yang terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian sari. Pindahkan dalam bejana tertutup dan biarkan di tempat sejuk terlindung dari cahaya matahari selama 2 hari, lalu pisahkan endapan yang diperoleh (Marjoni, 2016: 40).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Putri *et al* (2021) dapat disimpulkan bahwa metode yang paling efektif untuk mengekstraksi senyawa dari daun kelor (*Moringa oleifera* L.) adalah metode maserasi pada variasi waktu

5 jam karena metode maserasi menghasilkan nilai absorbansi yang tertinggi yaitu 3.267 pada panjang gelombang 206 nm. Sedangkan menggunakan metode MAE (*microwave assisted extraction*) menghasilkan nilai absorbansi 3,186 pada variasi waktu 1 jam dengan panjang gelombang 204 nm.

Kelebihan dari ekstraksi maserasi adalah peralatan dan teknik pengerjaan yang relatif sederhana dan mudah dilakukan. Sedangkan, kekurangan dari ekstraksi maserasi adalah memerlukan banyak waktu, dan proses penyariannya tidak sempurna karena zat aktif hanya mampu terekstraksi sebesar 50% (Marjoni, 2016: 46).

b. Perkolasi

Perkolasi adalah proses penyarian dengan cara melewatkan pelarut yang cocok pada simplisia secara lambat dalam suatu wadah yang disebut percolator. Prinsip perkolasi adalah penyarian zat aktif yang dilakukan dengan cara mengalirkan suatu pelarut melalui simplisia yang telah terlebih dahulu dibasahi selama waktu tertentu, kemudian ditempatkan dalam suatu wadah berbentuk silinder yang diberi sekat berpori pada bagian bawahnya (Marjoni, 2016: 49-50).

2. Cara panas

a. Refluks

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. (Ditjen POM, 2000:11).

b. Soxhlet

Soxhlet merupakan ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik (Ditjen POM, 2000:11).

Sokhletasi digunakan pada pelarut organik tertentu. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membasahi

sampel, secara teratur pelarut tersebut akan dimasukkan kembali kedalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut (Fernanda dan Sudarwati. 2019:23).

c. Digesti

Digesti merupakan proses ekstraksi yang cara kerjanya sama dengan maserasi, hanya saja digesti menggunakan pemanasan rendah pada suhu 30-40°C. metode ini biasanya digunakan untuk simplisia yang tersari baik pada suhu biasa (Marjoni, 2016: 21).

d. Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air temperature penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, suhu pada 96-98°C) selama waktu tertentu (15 - 20 menit) (Ditjen POM, 2000:11). Infusa merupakan sediaan cair yang dibuat dengan cara menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90°C selama 15 menit (Marjoni, 2016: 21).

e. Dekokta

Dekokta adalah infus pada waktu yang lebih lama (30°C) dan temperatur sampai titik didih air (Ditjen POM, 2000:11).

Proses penyarian dekokta hampir sama dengan infusa, perbedaannya hanya terletak pada lamanya waktu pemanasan. Waktu pemanasan pada dekokta lebih lama dibandingkan metode infusa, yaitu 30 menit dihitung setelah suhu mencapai 90°C menit (Marjoni, 2016: 21).

E. Skrining Senyawa Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk menganalisis kandungan bioaktif yang berguna untuk pengobatan. Pendekatan secara skrining fitokimia pada hakikatnya adalah analisis secara kualitatif dari kandungan kimia yang terdapat di dalam tum- buhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga dan biji) terutama kandungan metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif seperti alkaloid, antrakuinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin, tannin, polifenol dan minyak atsiri (Marjoni, 2016).

Kandungan senyawa metabolit sekunder dapat dipengaruhi oleh faktor fisik, genetik, dan faktor stress lingkungan (Setyorini & Yusnawan, 2017). Setiap ekosistem pasti memiliki kondisi lingkungan yang berbeda. Seperti halnya pada produksi senyawa metabolit sekunder yang berhubungan erat dengan faktor lingkungan tempat tumbuh tanaman.

Temperatur tempat tumbuh yang berbeda juga akan mempengaruhi metabolit sekunder pada tanaman. Cahaya matahari mempengaruhi produksi metabolit sekunder, karena cahaya matahari dimanfaatkan tumbuhan untuk proses fotosintesis. Hasil fotosintesis berupa karbohidrat kemudian diolah dan akan menjadi senyawa bioaktif. Kenaikan kelembapan akan memacu pembentukan metabolit sekunder sebagai mekanisme pertahanan secara fisiologis (Nurnasari & Djumadi, 2010). Perbedaan pH pada tanah juga mempengaruhi kadar senyawa hasil dari proses metabolit sekunder. Apabila tanah dan air memiliki pH yang tinggi, maka kadar senyawa bioaktifnya juga tinggi (Kusbiantoro, 2018).

Serbuk simplisia atau ekstrak yang akan diuji terlebih dahulu dimasukan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan reagen pendeteksi. Perubahan yang terjadi pada sampel akan menentukan kandungan senyawa yang terkandung dalam tanaman tersebut (Purwati dkk, 2017).

1. Alkaloid

Pada tanaman, alkaloid ditemukan dalam bentuk garam yang larut dalam air seperti sitrat, malat, tartrat, isobutirat, benzoat, atau kadang-kadang kombinasi dengan tanin. Secara mikrokina. ditemukan bahwa alkaloid banyak ditemukan pada jaringan perifer dari batang atau akar. Alkaloid merupakan salah satu metabolisme sekunder yang terdapat pada tumbuhan, yang biasa dijumpai pada bagian daun, ranting, biji dan kulit batang. Alkaloid mempunyai efek dalam bidang kesehatan berupa pemicu sistem saraf, menaikkan tekanan darah, mengurangi rasa sakit, antimikroba, obat penenang, obat penyakit jantung dan lain-lain (Marjoni, 2016: 8).

Menurut Marjoni (2016) dalam melakukan pengujian terhadap alkaloid, dapat dilakukan dengan beberapa metoda atau cara, diantaranya adalah:

a. Cara 1

Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml air suling, dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut:

- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer menghasilkan endapan putih/kuning.
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Boucharlat menghasilkan endapan coklat – hitam.
- Diambil 3 tetes filtrat, lalu ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof menghasilkan endapan merah bata.

Apabila terdapat endapan putih paling sedikit dengan 2 atau 3 dari pengujian diatas, maka simplisia dinyatakan positif mengandung alkaloida.

b. Cara 2

Menggunakan Metode Culvenor dan Fitzgerald:

Sebanyak 4 gram sampel yang dirajang dan gerus halus dalam lumpang dengan pasir bersih dan dibasahi dengan 10 ml Kloroform. Tambahkan 10 ml larutan Kloroform amoniak 0,05 N, gerus perlahan dan saring ke dalam tabung reaksi, tambahkan 0,5 ml asam sulfat 2 N, kocok selama 2 menit sampai terjadi pemisahan. ambil lapisan asam tambahkan pereaksi Mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya kabut putih hingga endapan putih.

2. Flavonoid

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, 2017:106).

Menurut Marjoni (2016) dalam melakukan pengujian terhadap flavanoid, dapat dilakukan dengan beberapa metoda atau cara, diantaranya adalah:

a. Cara 1

Sebanyak 10 g serbuk simplisia ditambahkan dengan 100 ml air panas. Campuran kemudian dididihkan selama lebih kurang 5 menit, kemudian disaring ketika panas. Sebanyak 5 ml filtrate yang diperoleh, ditam- bahkan 0,1 g serbuk Mg, 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoida positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol.

b. Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 gram sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan air ditambahkan dengan HCl 0,1 ml dan beberapa butir logam Mg, reaksi positif jika terjadi warna merah muda sampai merah.

3. Tanin

Tanin merupakan suatu senyawa polifenol yang tersebar luas dalam tumbuhan dan pada beberapa tanaman, terutama terdapat dalam jaringan kayu seperti kulit batang dan jaringan lain yaitu daun dan buah. Tanin berbentuk amorf yang mengakibatkan terjadinya koloid dalam air, memiliki rasa sepat dengan protein membentuk endapan yang menghambat kerja enzim proteolitik, serta dapat digunakan dalam industri sebagai penyamak kulit hewan. Sifat tanin sebagai astringen dapat dimanfaatkan sebagai antidiare, menghentikan perdarahan, dan mencegah peradangan terutama pada mukosa mulut, serta digunakan sebagai antidotum pada keracunan logam berat dan alkaloid. Selain itu, tanin juga digunakan sebagai antiseptik karena mengandung gugus fenol (Hanani, 2017:79).

Menurut Marjoni (2016) dalam melakukan pengujian terhadap tanin, dapat dilakukan dengan beberapa metoda atau cara, diantaranya adalah :

a. Cara 1

Sebanyak 0,5 g sampel diekstrak menggunakan 10 ml aquadest. Hasil ekstraksi disaring kemudian filtrat yang diperoleh diencerkan dengan aquadest sampai tidak berwarna. Hasil pengenceran ini diambil sebanyak 2 ml, kemudian ditambahkan dengan 1-2 tetes besi (III) klorida. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

b. Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 gram sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan air ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃. Reaksi positif untuk tannin bila terbentuk warna biru.

4. Saponin

Saponin berasal dari kata Latin yaitu "sapo" yang berarti mengandung busa stabil bila dilarutkan dalam air. Kemampuan busa dari saponin disebabkan oleh kombinasi dari sapogenin yang bersifat hidrofobik (larut dalam lemak) dan bagian rantai gula yang bersifat hidrofilik (larut dalam air) (Naoumkina; et. al., 2010:850).

Menurut Marjoni (2016) dalam melakukan pengujian terhadap saponin, dapat dilakukan dengan beberapa metoda atau cara, diantaranya adalah :

a. Cara 1

Sebanyak 0,5 g sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 ml air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 110 cm. Pada penambahan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

b. Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 gram sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan air dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dikocok. Reaksi positif jika terbentuk busa yang menetap selama 15 menit dan tidak hilang dengan penambahan HCl2N.

5. Steroid dan Triterpenoid

Steroid merupakan senyawa turunan dari hidrokarbon 1,2-Siklopentenoperhidrofenantrena. Pada alam, steroid terdapat pada hewan dan tumbuhan. Secara umum, steroid pada tumbuhan terdapat dalam bentuk sterol. Steroid merupakan salah satu golongan senyawa yang cukup penting dalam bidang medis. Lebih dari 150 jenis golongan steroid telah terdaftar sebagai obat. Dalam dunia medis, steroid digunakan sebagai bahan obat dan kontrasepsi seperti androgen yang merupakan hormon steroid yang dapat menstimulasi organ seksual jantan, estrogen yang dapat menstimulasi organ seksual betina, dan adrenokortikoid yang dapat mencegah peradangan dan rematik (Suryelita, Sri, Nivi, 2017:87).

Triterpenoid merupakan komponen tumbuhan yang memiliki bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan sebagai minyak atsiri. Triterpenoid adalah senyawa yang memiliki kerangka karbon yang berasal dari 6 satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C₃₀ asiklik, yaitu skualena. Senyawa ini berstruktur siklik yang berupa alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Harborne, 1987 dalam Lailah, 2014).

Menurut Marjoni (2016) dalam melakukan pengujian terhadap Steroid dan Triterpenoid dapat dilakukan dengan beberapa metoda atau cara, diantaranya adalah :

a. Cara 1

Sebanyak 1 g sampel di maserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap. Pada sisa ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Timbulwarna ungu atau merah kemudian berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya steroida triterpenoida.

b. Cara 2

Dilakukan menurut cara Simes dkk, dimana 4 gram sampel yang digiling halus dalam lumpang, dididihkan dalam 25 ml etanol selama 15 menit, disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh dikeringkan. Ekstrak kering yang diperoleh ditambahkan dengan air suling dan kloroform masing-masing 5 ml, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yaitu lapisan air dan lapisan kloroform. Lapisan kloroform disaring dengan cara melewati larutan dalam pipet kecil berisi norit dan filtrat yang diperoleh di tampung pada tiga lubang plat tetes, biarkan mengering, kemudian tambahkan pada lubang pertama H_2SO_4 pekat, lubang kedua asetat anhidrat dan H_2SO_4 dan asetat anhidrat pada lubang ketiga. Jika terbentuk warna merah pada lubang ketiga berarti positif terpenoid dan warna hijau atau biru menandakan positif steroid.

F. 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 517 nm dengan warna violet gelap (Lung dan Destiani, 2017: 54). Prinsip dari pengukuran antioksidan dengan menggunakan metode ini adalah dengan mengukur pemudaran warna yang terjadi pada larutan DPPH akibat adanya antioksidan yang menetralkan molekul radikal bebas. Radikal bebas yang awalnya berwarna ungu, akan kehilangan warnanya dan tergantikan

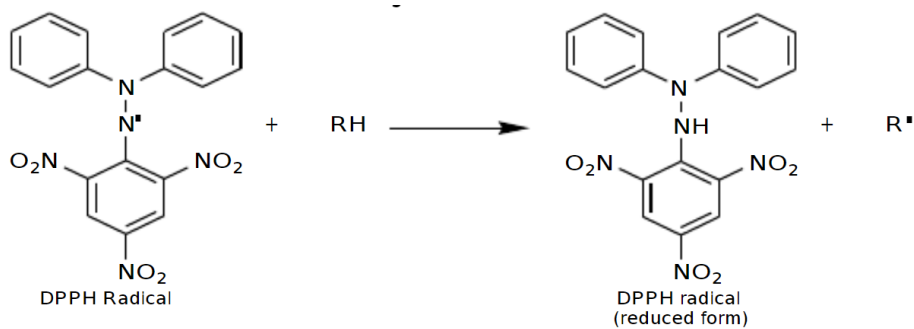
dengan terbentuknya larutan warna kuning. Hal ini terjadi karena larutan DPPH telah mendapatkan elektron dari senyawa antioksidan (Wulan, Yudistira, Rotinsulu, 2019:111).

Pengukuran antioksidan dengan menggunakan metode DPPH sangat menguntungkan karena sederhana, cepat, dan murah karena tidak membutuhkan banyak reagen (Anggraito; dkk, 2018). Penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH dapat memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Parameter untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah konsentrasi inhibisi (IC_{50}). IC_{50} merupakan konsentrasi suatu bahan antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal. Semakin rendah nilai IC_{50} , maka semakin baik aktivitas antioksidannya (Irianti; dkk, 2017:60).

Sebelum dilakukan pengukuran, DPPH dilarutkan dengan etanol maupun metanol, tergantung pelarut yang digunakan. Pengukuran DPPH dilakukan dengan memperhitungkan waktu inkubasi, dimana waktu yang dibutuhkan untuk kontak antara sampel dengan senyawa DPPH. Waktu inkubasi ini dipengaruhi oleh jenis antioksidan yang terdapat pada sampel yang diukur, karena sebagai antioksidan mempunyai kemampuan yang berbeda. Beberapa antioksidan sangat cepat (sekitar 1-2 menit) dan ada juga yang membutuhkan waktu lebih lama (15-60 menit) untuk bereaksi secara sempurna dengan DPPH (Anggraini, 2017:6).

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan dan menggunakan metode DPPH adalah adanya perubahan intensitas warna ungu pada DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa *Difenil Pikril Hidrazin* dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Perubahan warna ini akan memberikan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC₅₀ (Inhibitory concentration) (Prawirodihardjo, 2014).



Sumber : Unuigbe *et al*, 2014

Gambar 2. 4 Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan

Tabel 2.1 Kategori kekuatan aktivitas antioksidan
(Nasution, Batubara, Surjanto, 2015:6)

| No | Kategori | Konsentrasi (µg/mL) |
|----|-------------|---------------------|
| 1 | Sangat kuat | <50 |
| 2 | Kuat | 50 – 100 |
| 3 | Sedang | 101 – 150 |
| 4 | Lemah | 151 – 200 |

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

ABTS merupakan senyawa radikal kation organik yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bereaksi pada pH 7,4 berdasarkan waktu dan persentase diskolorasi sebagai bagian dari fungsi konsentrasi. Aktivitas dari

ABTS ditandai dengan perubahan warna yang terjadi dari biru atau hijau, menjadi tidak berwarna (Risma, 2022:10).

Pengukuran ABTS dilakukan, untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mendonorkan radikal proton, sehingga tercapai kestabilan. Kalorimeter digunakan untuk menghitung secara kuantitatif kemampuan antioksidan tersebut pada panjang gelombang 734nm. Sama seperti pengukuran lain, pengukuran metode ini menggunakan antioksidan pembanding sebagai kurva standar, seperti alpha-tocopherol, glutathione, dan uric acid. Kelebihan pada penggunaan metode ABTS atau biasa disebut sebagai TEAC dianggap sebagai metode yang mudah, cepat, dapat digunakan baik pada fasa aqueous ataupun lipid (Torres, 2018:56-57)

Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. Metode ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, bahkan pembentukan ABTS memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap (Setiawan, Yunita, Kurniawan, 2018:85).

3. FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Metode FRAP adalah metode yang digunakan untuk menguji antioksidan dalam tumbuh-tumbuhan (Septiana, 2021). Metode FRAP dilakukan berdasarkan kemampuan suatu senyawa dalam mereduksi kalium ferrisianida ($K_3Fe(CN)_6$) menjadi kalium ferrosianida ($K_4Fe(CN)_6$). Antioksidan dalam sampel akan mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} dengan memberikan sebuah elektron. Jumlah kompleks Fe^{2+} dapat diketahui dengan mengukur sampel pada panjang gelombang maksimum (Magfira, 2018).

Kelebihan metode FRAP ini yaitu metodenya murah, reagensinya mudah disiapkan dan cukup sederhana dan cepat (Maryam et al., 2016). Selain itu, mekanisme kerja metode FRAP seperti didalam tubuh (Yulianti, 2021).

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

CUPRAC merupakan metode untuk menentukan adanya aktivitas dan mengukur kapasitas antioksidan dari daun yodium terhadap radikal bebas yang

absorbansinya diukur pada *spektrofotometer UV-Vis* dengan panjang gelombang 450 nm (Risma, 2022:10). Pemilihan metode cuprac dalam pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas berdasarkan prinsip kemampuan sampel antioksidan yang mereduksi Cu^{2+} menjadi kompleks Cu^+ dengan ditandai perubahan warna biru menjadi kuning pada bercak senyawa. Pemilihan Cuprac untuk pengujian antioksidan disebabkan bahwa metode ini sederhana untuk penentuan aktivitas antioksidan dari sampel tanaman untuk mengolah berbagai matriks sampel yang terdapat dalam tanaman (Hafiz et al., 2020).

Metode ini juga memiliki kelebihan dibandingkan metode lainnya karena cukup cepat untuk mengoksidasi tiol yang merupakan salah satu golongan antioksidan. Reagen Cuprac dapat diakses reagen kromogenik lainnya dan lebih stabil serta dapat mengukur baik senyawa yang bersifat polar dan nonpolar dari antioksidan (Maryam, 2015)

G. Baku Pembanding

Baku Pembanding dalam artikel resmi Farmakope Indonesia tersedia sebagai bahan murni atau campuran bahan kimia seperti bahan obat atau eksipien tertentu. Penggunaan bahan-bahan ini ditentukan dalam masing-masing monografi dan umumnya digunakan dalam penetapan kadar atau uji identifikasi (Kemenkes, R.I., 2020:1811).

1. Baku Pembanding Cemaran
 - a) Cemaran organik yang terbentuk baik pada saat proses produksi maupun selama penyimpanan bahan dan dapat termasuk bahan awal, bahan antara, produk sampingan, pereaksi, katalisator, dan hasil urai.
 - b) Cemaran anorganik yang umumnya dihasilkan dari proses sintesis, termasuk pereaksi, katalisator, logam berat, dan garam anorganik.
 - c) Sisa pelarut yang dapat berupa larutan organik atau anorganik yang digunakan selama proses sintesis.

Baku pembanding cemaran dapat berupa bahan tunggal yang dimurnikan atau campuran lebih dari satu cemaran.

2. Bahan Perbandingan Bersertifikat

Bahan perbandingan bersertifikat adalah baku perbandingan yang memiliki sertifikat nilai karakteristik dengan ketidakpastian terkait dan ketertelusuran metrologi, yang sesuai dengan *International Organization for Standardization (ISO) Guide 30-35*.

3. Baku Perbandingan Farmakope Indonesia untuk Produk Biologi

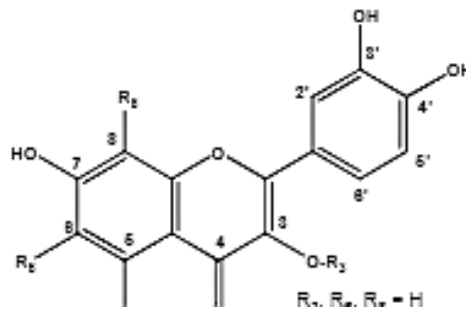
Ketentuan dan persyaratan baku perbandingan farmakope Indonesia untuk produk biologi dapat berbeda dalam satuan, definisi, atau standar lain yang diakui secara internasional. Baku Perbandingan Farmakope Indonesia dipersyaratkan dalam pengujian dan penetapan kadar pada Farmakope Indonesia.

4. Baku Uji Verifikasi Kinerja Farmakope Indonesia

Bahan ini digunakan untuk menganalisis atau untuk membantu penyesuaian operasi instrumen untuk memastikan bahwa hasil yang diperoleh akurat atau presisi, atau memberikan hasil yang bisa diterima. Seperti pada uji identifikasi antioksidan, baku perbandingan yang biasa digunakan salah satunya adalah kuersetin. Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar yang mempunyai aktivitas antioksidan. Kuersetin memiliki kemampuan mencegah proses oksidasi dari *Low Density Lipoproteins (LDL)* dengan cara menangkap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi (Minarno, 2015).

Kuersetin berasal dari bahan alam yang memiliki senyawa fenol yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa kuersetin memiliki lima gugus hidroksi (-OH) yang mengakibatkan senyawa ini memiliki kepolaran tinggi. Kuersetin dan flavonoid memiliki struktur Kimia yang hampir mirip sehingga dapat diasumsikan bahwa mekanisme hambatnya terhadap pertumbuhan bakteri sama dengan flavonoid (Herslambang, 2015).

Kuersetin merupakan senyawa antioksidan kuat yang terdapat pada daun kelor, dimana kekuatannya 4-5 kali lebih tinggi dibandingkan dengan vitamin C dan vitamin E (Jusnita dan Syurya, 2019).



Sumber : Kartasasmita *et al*, 2009

Gambar 2. 5 Struktur Inti Kuersetin

H. Spektrofotometri

Spektrofotometri merupakan suatu metoda analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor fototube. *Spektrofotometri* dapat dianggap sebagai perluasan suatu pemeriksaan visual dengan studi yang lebih mendalam dari absorpsi energi. Absorpsi radiasi oleh suatu sampel diukur pada berbagai panjang gelombang dan dialirkan oleh suatu perkam untuk menghasilkan spektrum tertentu yang khas untuk komponen yang berbeda (Khopkar,1990).

Teknik yang sering digunakan dalam analisis farmasi meliputi *spektrofotometri* serapan *ultraviolet*, cahaya tampak, infra merah dan serapan atom. Jangkauan gelombang yang tersedia untuk pengukuran membentang dari panjang gelombang pendek *ultraviolet* sampai ke infra merah dan serapan atom. Untuk memudahkan pengacuan, daerah spektrum dibagi dalam dalam daerah *ultraviolet* (190-380 nm), cahaya tampak (380-780 nm), IR dekat (780-3000 nm) dan IR jauh (2,5 -40 μm) (FI edisi IV, 1995).

Spektrofotometri absorpsi (serapan) berguna untuk mengkarakterisasikan gugus fungsi dalam suatu molekul dan untuk analisis kualitatif. Pengukuran absorbansi atau transmitansi *spektrofotometri* serapan *ultraviolet*-cahaya tampak (UV-Vis) digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif spesies kimia

(Khopkar, 1990). Tetapi spektrum *ultraviolet* atau cahaya tampak suatu zat pada umumnya tidak mempunyai derajat spesifikasi yang tinggi, namun demikian *spectrum* tersebut bermanfaat sebagai tambahan untuk identifikasi (FI edisi IV, 1995).

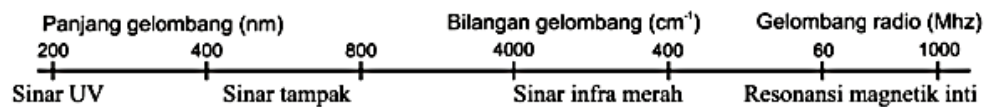
Bagian molekul yang mengabsorpsi dalam daerah *ultraviolet* dan cahaya tampak dinyatakan sebagai kromofor. Dalam suatu molekul dapat dikandung beberapa kromofor (Roth dan Blaschke, 1994). Suatu berkas radiasi elektromagnetik bila dilewatkan melalui sampel kimia sebagian akan diabsorpsi dan sebagian lagi akan diteruskan. Konsentrasi larutan berwarna diukur dengan melihat absorbansi sinar. Pada daerah tampak konsentrasi dapat ditentukan dengan tiga teknik yaitu kolorimetri visual, fotometri, dan *spektrofotometri*. Teknik yang terakhir inilah yang dapat digunakan untuk mengukur absorbansi dalam daerah tampak dan ultraviolet, sedangkan dua teknik yang pertama terbatas hanya pada pengukuran daerah tampak (Khopkar, 1990).

Pengujian dan penetapan kadar secara *spektrofotometri* biasanya memerlukan suatu baku pembanding. Hal ini memastikan bahwa pengukuran dilakukan pada kondisi penetapan yang sama untuk spesimen uji dan zat pembanding, yang meliputi pengaturan lebar celah, penempatan sel dan koreksi sel serta arus transmitannya (FI edisi IV, 1995).

Spektrum cahaya matahari dapat dilihat secara alami yaitu dalam bentuk pelangi. Pada tahun 1672 Newton dapat menunjukkan bahwa pemecahan radiasi sinar matahari menjadi komponen-komponennya yang berwarna dapat dilakukan dengan menggunakan prisma dari gelas. Sinar matahari seperti halnya sinar lampu memiliki sifat polikromatik. Bila sinar matahari/lampu dikenakan pada prisma maka sinar akan mengalami pembiasan dan hasil yang diperoleh merupakan sinar monokromatik. Bila layar dibentangkan pada sisi lain dari prisma maka akan terlihat berbagai warna sinar sebagai berikut: violet/ungu, nila, biru, hijau, kuning, jingga dan merah. Sinar-sinar tersebut disebut sebagai spektrum sinar tampak/terlihat yang memiliki kisaran panjang gelombang 400-800 nm. Namun untuk sinar matahari masih terdapat dua komponen sinar yang

tidak terlihat oleh indera mata yaitu sinar ultraviolet (UV) dan sinar inframerah. Radiasi yang dipancarkan dari suatu sumber dapat dilihat oleh mata bila radiasi terletak dalam daerah spektrum terlihat. Sistem deteksi lain perlu digunakan jika radiasi terletak di luar daerah tersebut.

Sinar ditinjau berdasarkan kisaran panjang gelombang dapat dinyatakan sebagai berikut:



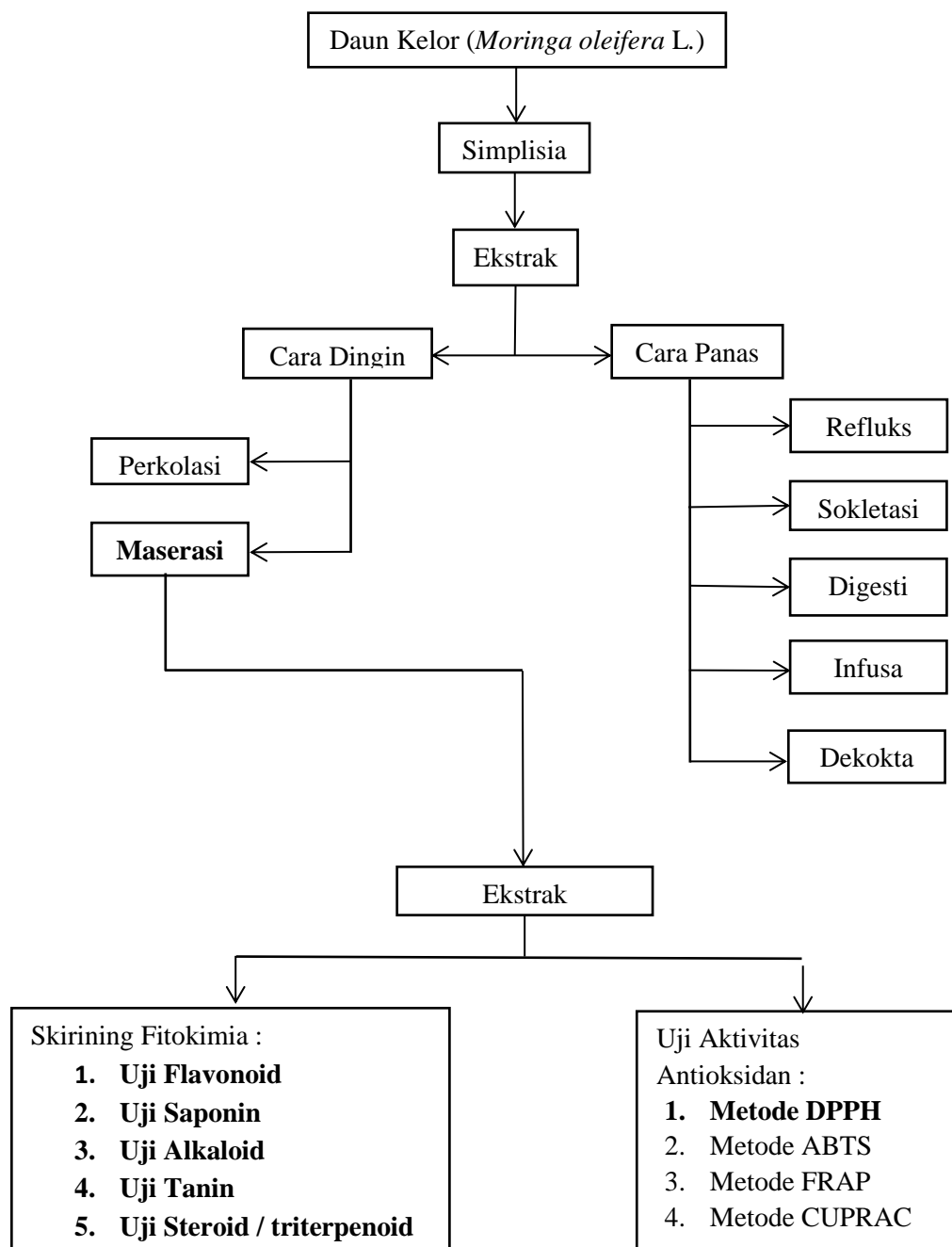
Sumber : Dasar-dasar Spektroskopi

Gambar 2. 6 Panjang Gelombang Elektromagnetik

Panjang gelombang yang dikaitkan dengan cahaya tampak mampu mempengaruhi selaput pelangi mata manusia dan menimbulkan kesan subyektif akan ketampakan (vision). Namun, banyak radiasi yang dipancarkan oleh benda panas terletak di luar daerah di mana mata itu peka, mengenai daerah UV dan inframerah dari spektrum yang terletak di kiri dan kanan daerah tampak. Dalam jurnal Setiawan (2017) analisis secara spektrofotometri terdapat tiga daerah panjang gelombang elektromagnetik yang digunakan, yaitu:

1. Daerah UV ; λ = 200 – 380 nm
2. Daerah visible (tampak); λ = 380 – 700 nm
3. Daerah inframerah (IR); λ = 700 nm– 3000 nm

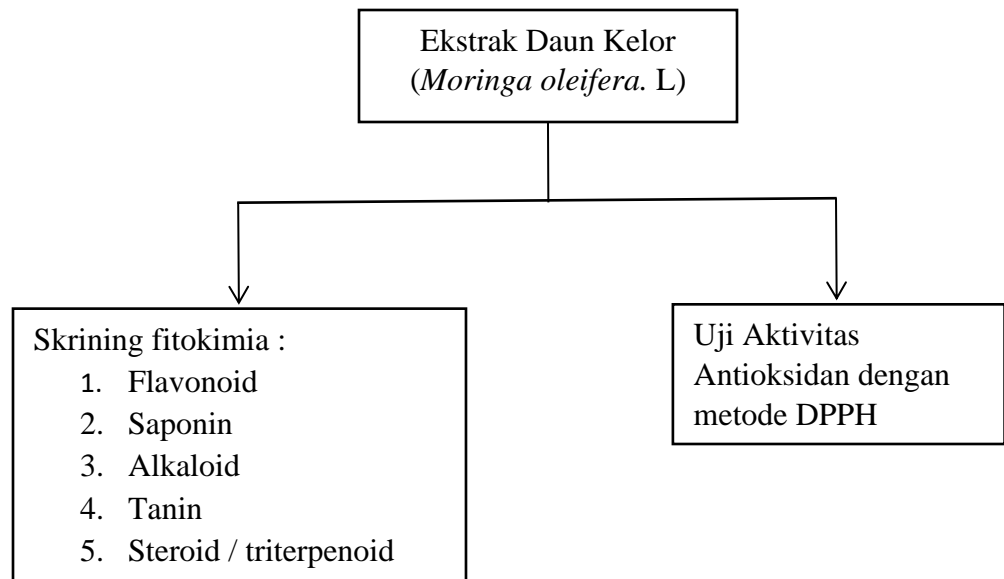
I. Kerangka Teori



Sumber : Marjoni, 2016.

Nofanda, 2022

Gambar 2. 7 Kerangka Teori

J. Kerangka Konsep

Gambar 2.8 Kerangka Konsep

K. Definisi Operasional

Tabel 2.2 Definisi Oprasional

| Variable Penelitian | Definisi Oprasional | Cara Ukur | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala Skor |
|--|--|-----------|--------------------------------|--|------------|
| Ekstrak kental etanol daun kelor (<i>Moringa oleifera</i> L.) asal desa merak belantung | Ekstrak etanol daun kelor asal desa merak belantung yang akan dilakukan skrining fitokimia dan uji antioksidan | Observasi | Neraca Analitik | Rendemen | Rasio |
| Senyawa Flavonoid | Senyawa yang teridentifikasi apabila terbentuk warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol pada uji flavonoid (Marjoni, 2016) | Observasi | Panca Indera Penglihatan/ 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 apabila terbentuk buih pada saat penambahan larutan HCl 2 N (Marjoni, 2016) | Observasi | Panca Indera Penglihatan/ Mata | (+) terbentuk buih pada saat penambahan larutan HCl 2 N (-) tidak terbentuk buih pada saat penambahan larutan HCl 2 N | Nominal |
| Senyawa Alkaloid | Senyawa yang teridentifikasi jika terbentuk endapan setelah direaksikan | Observasi | Panca Indera Penglihatan/ Mata | (+) terbentuk endapan pada sampel yang telah direaksikan dengan reagen (minimal dua | Nominal |

| Variable Penelitian | Definisi Oprasional | Cara Ukur | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala Skor |
|--------------------------------|--|-----------|--------------------------------|--|------------|
| | dengan pereaksi Dragendorf, Bauchardat, dan Mayer (Marjoni, 2016) | | | pereaksi yang menghasilkan endapan) (-) tidak terbentuk endapan pada ketiga sampel yang direaksikan dengan ketiga reagen atau hanya satu pereaksi yang menghasilkan endapan | |
| Senyawa Tanin | Senyawa yang teridentifikasi apabila terbentuk warna biru atau hijau kehitaman saat penambahan pereaksi FeCl ₃ (Marjoni, 2016) | Observasi | Panca Indera Penglihatan/ 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 | Observasi | Panca Indera Penglihatan/ Mata | (+) terbentuk warna biru hingga hijau atau merah hingga ungu (-) tidak terbentuk warna biru hingga hijau atau merah hingga ungu | Nominal |

| Variable Penelitian | Definisi Oprasional | Cara Ukur | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala Skor |
|-----------------------|--|-----------|-------------------------|-----------------|------------|
| | <p>ungu yang menunjukkan positif mengandung triterpenoid saat direaksikan dengan larutan pereaksi Lieberman Burchard (Marjoni, 2016)</p> | | | | |
| Aktivitas Antioksidan | <p>Besarnya hambatan aktivitas radikal bebas dengan menghitung IC_{50}</p> | Observasi | <i>Spektrofotometer</i> | Nilai IC_{50} | Ordinal |