

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Radikal Bebas

Radikal bebas ialah atom maupun molekul yang terdapat elektron tidak berpasangan. Dengan terdapat elektron tidak berpasangan, membuat Penyerangan dan pengikatan elektron molekul yang berbeda di sekitarnya guna mencari pasangan, menjadi salah satu cara suatu molekul atau senyawa dapat menjadi reaktif. Radikal bebas dapat memberikan dampak yang berbahaya saat elektron berikatan dengan senyawa radikal bebas yang memiliki ikatan senyawa kovalen. Salah satu dampak bahaya dari radikal bebas pada tubuh manusia ialah dapat mengakibatkan penyakit degeneratif seperti penuaan dini, rematik, katarak, liver sampai dapat mengakibatkan penyakit jantung koroner. Namun, radikal bebas juga dapat menimbulkan dampak yang tidak begitu berbahaya disaat elektron telah berikatan dengan senyawa radikal bebas yang memiliki sifat ionik, dengan begitu dampak berbahaya dari radikal bebas dapat berkurang (Anggarani *et al.*, 2023).

Saat tubuh memiliki tingkat radikal bebas yang tinggi, hal ini dapat menyebabkan *stress oxidative*, Radikal bebas sendiri dapat menjadi radikal bebas endogen di mana radikal bebas ini bersumber dari tubuh, serta radikal bebas eksogen yang bersumber dari beberapa proses metabolisme dan respirasi aerobik (Maharani, dkk 2021).

B. Antioksidan

Antioksidan ialah senyawa maupun molekul yang cukup stabil yang bisa meredam dan menetralkan senyawa radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron atau hidrogennya. Antioksidan ini dapat menghambat atau menunda kerusakan sel karena memiliki sifat dapat menangkal radikal bebas (Ibroham *et al.*, 2020). Antioksidan sendiri dibedakan atas dua jenis yakni antioksidan endogen (enzim) dan antioksidan eksogen (vitamin). Di mana antioksidan endogen sendiri berasal dari dalam tubuh manusia meliputi katalase, *superoksida dismutase* (SOD) dan *glutation peroksidase* (GPx). Sementara itu,

antioksidan eksogen dapat diambil dari suplemen maupun juga makanan, seperti Vitamin E, Vitamin C atau asam askorbat dan beta karoten atau pro vitamin A (Maharani., *et al.*, 2021:393).

Belakangan ini antioksidan yang biasa digunakan manusia ialah antioksidan alami juga sintetik. Antioksidan sintetik ialah antioksidan yang disintesis dengan kimiawi, yang biasa digunakan oleh industri pangan dan makanan, di antara antioksidan sintetis ini yang biasa digunakan misalnya *butyl hidroksil anitol* (BHA), *butyl hidroksi toluene* (BHT), *tert-Butil Hidroksi Buinon* (TBHQ) dan Propel galat (Kamoda *et al.*, 2021).

Merujuk pada peraturan BPOM tentang batas maksimum asupan harian penggunaan antioksidan sintetis BHA adalah 400mg/kg berat badan dan penggunaan batas harian pada BHT adalah 400mg/kg berat badan (BPOM RI, 2023:20) Oleh karena itu, penggunaan antioksidan sintetis yang berlebih dikhawatirkan dapat meningkatkan efek samping dari antioksidan sintetis itu sendiri, yaitu menyebabkan keracunan serta meningkatkan efek karsinogenik (penyebab penyakit kanker) (Kurniawati & Sutoyo, 2021). Oleh karena itu, agar terhindar dari pengaruh yang tidak diinginkan akibat antioksidan sintetis, alternatif yang dapat digunakan untuk memenuhi kebutuhan antioksidan pada manusia ialah dengan antioksidan alami.

Salah satu antioksidan alami yang bisa diambil dari tumbuhan, di mana pada tumbuhan ini mengandung senyawa fenolik yang berasal dari biji, buah, akar, bunga, kayu ataupun daun. Senyawa fenolik maupun polifenolik bisa berbentuk golongan flavonoid, golongan ini ialah senyawa anti radikal bebas yang bisa mengubah maupun mereduksi radikal bebas itu sendiri. Oleh karena itu, senyawa flavonoid memegang peranan penting pada kehidupan manusia, dan juga menjadi antioksidan yang relatif aman serta tanpa efek samping, senyawa flavonoid ini juga dapat dimanfaatkan sebagai antimutagenik, antineoplastik dan aktivitas vasodilatator (Chopipah & Solihat, 2021).

Antioksidan pada tubuh manusia dibagi dalam 3 kategori berdasarkan meknisme kerja dan fungsinya, yaitu (Kesuma dan Rina, 2015:32-38) :

1. Antioksidan primer

Ialah antioksidan yang bermanfaat pada pencegahan timbulnya senyawa radikal bebas, bersifat sebagai pemutus reaksi berantai (*chain-breaking*). Contohnya seperti albumin, vitamin A, flavonoid dan fenolat.

2. Antioksidan Sekunder

Ialah antioksidan yang bermanfaat pada penangkapan radikal bebas serta dapat menjadi pencegah timbulnya reaksi berantai dan sebagai pengikat ion logam. Contohnya yakni *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutation Peroxidase* (GPx) serta Katalase.

3. Antioksidan Tersier/Repair Enzyme

Adalah antioksidan yang bermanfaat untuk memulihkan kerusakan biomolekul atau jaringan yang telah mengalami kerusakan akibat radikal bebas. Contohnya yakni DNA *repair enzyme*, sulfosida reduktase, protease dan lipase.

C. Tanaman Obat

Tumbuhan obat ialah segala jenis tumbuhan yang kandungan bagian, keseluruhan tumbuhan maupun sekresinya dapat dimanfaatkan untuk obat, pengobatan, bahan atau ramuan (Muhammad dkk, 2017:2). Tumbuhan obat sendiri dalam dunia farmasi sudah dimanfaatkan sebagai bahan baku obat-obatan modern. Di Indonesia, diperkirakan sekitar 80% masyarakatnya telah menggunakan tumbuhan obat dalam merawat dan menjaga kesehatan secara tradisional. (Syarif, Nur & Lindsari, Iva, 2018:4).

D. Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.))

Cengkeh ialah tanaman yang mempunyai Sinonim cengkeh yakni (*Syzygium aromaticum* L.) Merr & Perry, *Eugenia aromatica*, *Carphyllus aromaticus*, *Jambos carryhopyllus* (Thomas, 2007). Menurut Bulan (2004) dalam buku Penelusuran senyawa Tumbuhan Cengkeh Klasifikasi Tanaman Cengkeh ialah berikut :

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledoneae
 Ordo : Myrtales
 Familia : Myrtaceae
 Genus : *Syzygium*
 Species : *Syzygium aromaticum* (L.)



Sumber: <https://bit.ly/Tanamancengkeh>

Gambar 2.1 Daun Cengkeh.

1. Morfologi tanaman cengkeh

Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) adalah tumbuhan yang mampu tumbuh melebihi seratus tahun lamanya. Pohonnya dapat mencapai tinggi hingga 20-30 meter . Bunga pada tanaman cengkeh berbilang 4, serta memiliki warna merah jambu tertata pada tandan maupun malai rata yang muncul melalui ujung ujung cabang atau ketiak daun. Daunnya tunggal bangun kerucut maupun panjang dan memiliki pangkal yang kaku, warna hijau kekuning kuningan atau hijau muda dan sisi mengkilap dibagian atas serta memiliki bintik-bintik (kelenjar minyak). Kelopak tanaman cengkeh berbentuk mangkuk serta buahnya seperti buah buni yang bentuknya bulat telur terbalik atau memanjang (Mu'nisa, 2023). Batang tanaman cengkeh memiliki ranting yang kuat, kayu yang keras dan bercabang 6 panjang, padat, dan tumbuh lurus. Sedangkan kulit kayunya sendiri berwarna abu-abu (Aulia dan Isvi, 2021).

Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) membutuhkan minimal 8 jam per hari sinar matahari, oleh karenanya tumbuhan ini dapat hidup di iklim yang panas dan curah hujan yang cukup merata. Tanaman cengkeh cocok hidup

di ketinggian 900 meter di atas permukaan laut. Memiliki suhu optimal 60-80° (Dinas Pertanian, 2018).

2. Manfaat dan Kandungan Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.)

Salah satu komponen utama yang terkandung dalam tanaman cengkeh adalah eugenol yang ada dalam minyak cengkeh, total kadar eugenol pada tanaman cengkeh dalam minyak cengkeh mencapai 83-95%. Pada satu tanaman cengkeh terdapat 17% eugenol pada bunga cengkeh yang sudah banyak dimanfaatkan. Sementara itu pada daun cengkeh sendiri terdapat kandungan eugenol sebesar 2% yang saat ini masih terabaikan dan kurang dimanfaatkan. Eugenol dapat dimanfaatkan untuk antioksidan dalam menghambat lipid peroksidasi dan eugenol serta vitamin E juga digunakan untuk menghambat oksidasi LDL dan VLDL (Mu'nisa, 2023:31-32).

Tanaman cengkeh mengandung senyawa alkaloid, glikosida, saponin, tannin serta flavonoid. Dimana senyawa ini memiliki sifat racun alelopati ialah senyawa yang bersumber dari gula yang berikatan dengan flavon. Flavonoid sendiri memiliki karakter yang khas, seperti rasa pahit, larut di air serta pelarut organik, dapat diurai dengan mulai serta memiliki bau yang tajam (Talahatu & Papilaya, 2015).

Flavonoid sendiri ialah salah satu senyawa fenol paling besar yang ada di alam. Biasanya, ditemukan pada beberapa tumbuhan dengan golongan senyawa polifenol dengan unit structural dasar 2-fenilkroman. Flavonoid juga digolongkan sesuai dengan struktur kimianya : flavanon, flavon, flavonol, flavan -3-ols, anthocyanin serta isolflavon. Ada banyak sekali manfaat yang ada pada senyawa flavonoid, diantaranya untuk anti-virus, anti inflamasi, anti kanker, anti penuaan serta kardioprotektif (Ariyanto *et al.*, 2022).

Golongan flavonoid mempunyai kerangka karbon yang didasari dari dua cincin benzene tersubstitusi yang terhubung oleh rantai alifatik tiga karbon. Pembagian kelompok flavonoid terbagi dari cincin heterosiklik-oksigen tambahan serta gugus hidroksil (Wahyulianingsih *et al.*, 2016). Di samping itu, minyak daun cengkeh pun dimanfaatkan pada beberapa pengobatan, seperti untuk obat sakit perut atau pencernaan, obat sakit gigi, juga sebagai obat batuk atau pernapasan. Selain itu, senyawa antioksidan yang terkandung dalam

cengkeh dapat membantu system kekebalan tubuh. Minyak cengkeh, juga dapat dimanfaatkan sebagai obat topikal untuk infeksi kulit atau luka. Kandungan antimikroba dalam cengkeh juga membantu melawan mikoorganisme patogen seperti bakteri dan juga jamur (Tresno Saras., 2023:4-5).

E. Simplisia

Simplisia adalah herbal kering yang berasal dari alam yang biasa dimanfaatkan sebagai pengobatan yang tidak melewati pengolahan lebih lanjut. Simplisia melalui proses pengeringan hingga mencapai suhu 60°C. disebut Simplisia segar ialah untuk bahan alam yang belum melalui proses pengeringan (Farmakope Herbal, 2017). Simplisia terbagi dalam simplisia nabati, hewani serta pelican (mineral). Simplisia nabati ialah simplisia yang berbentuk tanaman utuh, bagian tumbuhan maupun eksudat tumbuhan (Depkes RI, 2000).

F. Ekstraksi

Ekstraksi ialah metode penarikan zat aktif yang berasal dari bahan alam yang menggunakan pelarut yang tepat. Menurut Marjoni (2016) dalam bukunya "Dasar-dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi" ekstraksi tujuannya agar mengeluarkan segala zat aktif serta komponen kimia yang terkandung pada simplisia. Ekstraksi diawali ketika pelarut dapat melewati dinding sel dan lalu menuju rongga sel tumbuhan tempat menyimpan zat aktif. Kemudian aktifnya zat yang terlarut di bagian luar sel, akan terdifusi ke pelarut. Keadaan ini terulang sampai keseimbangan konsentrasi zat aktif pada sel serta di luar sel.

Ekstraksi ialah penarikan kandungan yang diinginkan dari suatu materi. Marjoni, 2016:18; Hanani, 2015:11 menyatakan berbagai aspek utama yang sebaiknya dipertimbangkan pada proses ekstraksi adalah sebagai berikut:

1. Kuantitas simplisia yang hendak diekstrak
2. Derajat kehalusan simplisia
3. Jenis pelarut yang akan dipakai
4. Waktu ekstraksi

5. Metode ekstraksi
6. Kondisi proses ekstraksi
7. Suhu dan tekanan

Ada dua metode untuk mengekstraksi simplisia, yakni ekstraksi dingin dan ekstraksi panas. Komposisi senyawa, pelarut yang digunakan, dan aksesibilitas alat ekstraksi harus dipertimbangkan ketika memilih teknik ekstraksi (Hanani, 2015:11). Berbagai cara ekstraksi yang akan dipakai ialah seperti berikut:

a. Metode Ekstraksi Dingin

Dalam metode ini, ekstraksi dikerjakan tidak dengan pemanasan. Hal ini bertujuan agar mencegah terjadinya kerusakan terhadap senyawa yang diekstraksi, terutama senyawa yang sensitif terhadap panas.

1. Maserasi

Maserasi adalah cara ekstraksi dengan simplisia tidak tahan panas. Proses ini dikerjakan dengan merendam simplisia pada suatu pelarut di suhu ruang ($20-30^{\circ}\text{C}$) dalam waktu-waktu tertentu untuk menghindari terjadinya penguapan pelarut yang terlalu besar. Pada saat proses maserasi diaduk dalam rentang 15 menit sehingga bahan serta pelarut dapat bercampur secara merata (Hanani, 2015:11).

Kelebihan dari metode maserasi adalah terdapat variasi yaitu metode kinetik melibatkan pengadukan dan digesti yang dikerjakan di suhu melebihi suhu kamar yakni pada $40-60^{\circ}\text{C}$ (Marjoni, 2016: 46).

2. Perkolasi

Perkolasi ialah prosedur ekstraksi di mana pelarut yang sesuai dialirkan perlahan melalui simplisia dalam sebuah tempat yang disebut perkolator. Prinsip perkolasi melibatkan ekstraksi zat aktif dengan mengalirkan suatu pelarut kedalam bubuk simplisia yang telah dibasahi sebelumnya. Campuran tersebut kemudian ditempatkan dalam wadah silinder dengan penghalang berpori di bagian bawah (Marjoni, 2016: 49-50).

b. Metode Ekstraksi Panas

Pada metode ini, proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pemanasan sepanjang prosedur. Penggunaan panas ini mempercepat proses

ekstraksi jika dibandingkan dengan metode tanpa pemanasan atau metode dingin, sehingga memungkinkan ekstraksi terjadi lebih efisien dan lebih cepat.

1. Refluks

Refluks adalah salah satu cara ekstraksi yang dikerjakan di titik didih pelarut, dalam rentang waktu tertentu dengan kuantitas pelarut yang relatif tetap serta dilengkapi dengan kondensor balik. Biasanya cara ini dilakukan untuk meningkatkan efisiensi dari suatu penyarian dan dikerjakan berulang-ulang (3-6 kali) pada residu pertama guna mencapai hasil yang lebih optimal. Di samping itu, metode ini juga kemungkinan terurainya senyawa yang tidak stabil terhadap panas (Hanani, 2015:11).

2. Soxhletasi

Soxhlet merupakan metode penyarian dengan pelarut baru secara periodik, dan umumnya dikerjakan dengan peralatan khusus untuk mencapai ekstraksi yang stabil, dilengkapi oleh pendingin balik (Hanan, 2015). Proses ini dimulai dengan pemanasan pelarut, yang kemudian naik dan mengembun pada pendingin udara hingga tetesan yang kemudian dikumpulkan kembali. Jika tetesan tersebut melalui batas lubang pipa samping Soxhlet, sirkulasi tersebut berlangsung berulang kali dan hasilnya ekstraksi akan optimal. Selama metode ekstraksi ini, pemilihan pelarut sangat penting. Pelarut yang ideal merupakan pelarut yang memiliki tingkat kelarutan tinggi pada zat yang akan diekstraksi karena daya larut dari suatu pelarut adalah menyangkut polaritas pelarut dan senyawa yang akan diekstraksi (Hanani, 2015:11).

3. Infusa

Bahan nabati diekstraksi menggunakan pelarut air di suhu 90°C hingga 15 menit untuk membuat infusa, sediaan cair. Infus terbuat dari bahan yang disederhanakan dari jaringan lunak, meliputi bunga dan daun, yang kaya akan minyak atsiri serta senyawa yang tidak dapat bertahan dalam pemanasan yang lama (Hanani, 2015:13).

4. Dekokta

Dekoktasi adalah salah satu cara ekstraksi yang dilakukan dengan merebus dengan air sebagai pelarut di suhu 90-95°C (titik didih air) dalam 30 menit.

Dengan pengecualian pada periode ekstraksi, prinsipnya hampir sama dengan infusa (Hanani, 2015:13).

5. Destilasi (Penyulingan)

Salah satu teknik ekstraksi berbasis panas adalah destilasi, yang bekerja berdasarkan penarikan atau ekstraksi zat yang menguap ketika air digunakan sebagai pelarut. Teknik ini biasanya digunakan untuk memisahkan minyak esensial yang ditemukan dalam tanaman (Hanani, 2015:13).

G. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Hanya spesies tertentu yang mampu mensintesis dan menghasilkan metabolit sekunder. Karena zat-zat ini tidak secara langsung berkontribusi pada keberadaan atau kelangsungan hidup individu, maka zat-zat ini disebut sebagai metabolit sekunder. Meskipun demikian, pada beberapa spesies, metabolit sekunder sering kali berfungsi sebagai penarik spesies lain dan mekanisme pertahanan (Endarini, 2016:114). Melalui struktur dasarnya, metabolit sekunder dibagi ke dalam beberapa golongan, yaitu alkaloid, terpenoid, steroid, flavonoid, dan saponin (Saidi dkk, 2018:12).

1. Alkaloid

Alkaloid ialah satu jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandung unsur nitrogen (N) dalam cincin heterosiklik serta memiliki sifat basa. Alkaloid biasanya merupakan zat padat warna putih, namun terdapat kelas alkaloid yang dalam bentuk cair seperti pada nikotin, serta terdapat juga kelas pada alkaloid-alkaloid yang memiliki warna kuning seperti pada berberin dan serpentin (Hanani, 2015:133).

Analisis alkaloid dilaksanakan melalui reaksi antara larutan sampel menggunakan tiga pereaksi, yakni pereaksi Mayer, Bouchardat, serta Dragendorff. Terbentuknya endapan menunjukkan interaksi yang berhasil antara sampel dan reagen. Reaksi positif dengan pereaksi Mayer ditandai munculnya endapan berwarna putih kekuningan. Senyawa alkaloid akan berinteraksi dengan ion tetraiodomerkurat (II) dan membentuk senyawa kompleks yang akan menimbulkan endapan (Sulistyarini, Sari, Wicaksono, 2020:59).

2. Flavonoid

Flavonoid tergolong senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam tumbuhan. Inti C6-C3-C6 dari molekul flavonoid ini mencakup dua cincin aromatik yang digabungkan dengan tiga atom karbon, biasanya dengan tautan oksigen heterosiklik ekstra. Secara umum, flavonoid terdapat dalam bentuk glikosida. Senyawa flavonoid dalam bentuk glikosida ini memudahkan senyawa flavonoid larut pada pelarut polar, meliputi metanol, etanol, butanol, serta etil asetat. Test identifikasi flavonoid positif dengan munculnya warna merah, kuning, serta jingga di lapisan amil alkohol. Ketika penambahan serbuk Mg serta HCl (P) di ekstrak tumbuhan yang flavonoid, kemudian nantinya membentuk garam flavilium warna merah maupun jingga (Hannani, 2015:103).

3. Tanin

Jaringan tanaman yang disebut tanin adalah bahan kimia polifenol yang biasanya ditemukan di jaringan kayu mencakup kulit batang serta jaringan lain meliputi daun serta buah. Tanin mempunyai rasa sepat dan mempunyai bentuk amorf, yang membuatnya menjadi koloid dalam air. Zat ini memiliki kemampuan untuk bereaksi dengan protein untuk menciptakan endapan yang menghentikan kerja enzim proteolitik (Hanani, 2015:79).

Reagen FeCl_3 ditambahkan ke ekstrak yang telah diencerkan untuk mengidentifikasi senyawa tanin yang ditemukan dalam tanaman. Perkembangan larutan berwarna biru atau hijau kehitaman adalah temuan positif yang menunjukkan sampel mengandung tanin (Marjoni, 2016:10). Tanin dalam ekstrak bereaksi dengan ion Fe^{3+} untuk menghasilkan senyawa kompleks, dan itulah sebabnya mengapa larutan sampel berwarna hijau kehitaman (Setyowati; dkk, 2014:276).

4. Saponin

Tanaman *saponaria vaccaria*, yang digunakan untuk membuat sabun dengan saponin, adalah sumber dari istilah “saponin”. Saponin terlarut di air, akan tetapi tidak dapat larut di eter serta dapat dihidrolisis menjadi aglikon. Saponin merupakan senyawa yang mempunyai bobot molekul tinggi dan banyak terkandung pada berbagai tumbuhan. Senyawa ini merupakan senyawa

glikosida, yakni molekul gula terikat dengan aglikon triterpen atau steroid (Hanani, 2015:227).

Senyawa saponin dapat dianalisis dengan melihat munculnya buih maupun busa yang stabil ketika ditambahkan larutan HCl 2N kepada ekstrak. Kejadian tersebut terjadi karena pada glikosida terdapat gugus yang mampu dalam keadaan larut dalam air membentuk buih yang pada proses hidrolisis terpecah menjadi glukosa dan produk lainnya (Setyowati, 2014:276).

5. Steroid/triterpenoid

Triterpenoid ialah senyawa dalam golongan terpenoid yang memiliki 30 rantai karbon. Karena zat ini sering ditemukan sebagai glikosida, pelarut polar seperti metanol dapat dengan mudah menghilangkannya dari kelompok alkohol (Septiandari, 2016:2). Triterpenoid mempunyai struktur siklik yang relatif kompleks dan sering dijumpai dalam bentuk alkohol maupun asam karboksilat yang tanpa memiliki warna serta kristal (Radam and Purnamasari, 2016:32).

Analisis steroid atau triterpenoid bisa dikerjakan dengan cara penambahan asam asetat anhidrat beserta H₂SO₄ (P) di residu sisa dari sampel yang sudah dimaserasi dengan N-heksan. Positif steroid ditandai dengan adanya warna biru maupun hijau dan warna merah atau ungu menandakan hasil positif triterpenoid (Marjoni, 2016:12-13).

H. Uji Antioksidan

Analisis antioksidan adalah suatu pengukuran kuantitatif pada kapasitas sebuah unsur untuk bertindak selaku agen pereduksi. Analisis ini dibedakan menjadi dua kategori, yaitu HAT dan SET. Meskipun kedua mekanisme ini sering muncul bersamaan, mereka memiliki cara kerja yang berbeda.

Identifikasi antioksidan adalah pengukuran kuantitatif pada kapasitas sebuah unsur untuk bertindak selaku agen pereduksi dan dibedakan menjadi dua kategori: HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) dan SET (*Single Electron Transfer*).

a. Metoda HAT

Mengevaluasi seberapa baik antioksidan dapat menetralkan radikal bebas dengan memberikan atom hidrogen. Teknik ini, yang dibedakan dengan pergeseran warna dari warna pewarna menjadi tidak berwarna, bekerja dengan baik untuk komponen fenolik. Contoh metode ini meliputi ABTS dan *Hydroxyl Radical Scavenging Assay* (ORACOH).

b. Metode SET

Prosedur ini didasarkan pada reaksi redoks di mana bahan kimia neon yang dikenal sebagai zat pengoksidasi berinteraksi dengan antioksidan. Spektrofotometer digunakan untuk mengukur pergeseran warna yang sesuai dengan konsentrasi antioksidan dalam sampel; pH dan pelarut yang digunakan berdampak pada prosedur ini.

Semakin besar perubahan warna yang terjadi, semakin tinggi proses reduksi yang menandakan aktivitas antioksidan yang lebih besar. FRAP, DPPH, HORAC, dan ABTS adalah beberapa jenis uji yang banyak digunakan pada analisis antioksidan.

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

Reaktivitas suatu senyawa terhadap radikal stabil dapat dinilai dengan menggunakan metode DPPH, yang mengukur antioksidan dengan mengamati pemudaran warna ungu ke kuning dalam larutan DPPH, yang disebabkan oleh adanya antioksidan yang menetralkan molekul radikal bebas. DPPH mempunyai warna ungu tua serta serapan yang kuat di panjang gelombang 515-520 nm (Wulan, Yudistira, Rotinsulu, 2019:111).

Metode DPPH banyak dipakai karena berbagai kelebihanannya antara lain: kesederhanaan, kemudahan, kecepatan pelaksanaan serta sensitivitasnya yang tinggi dengan kebutuhan sampel yang lebih sedikit. Molekul DPPH yang stabil serta bahan kimia pembanding seperti vitamin A, vitamin C, dan vitamin E diperlukan untuk prosedur ini (Julizan, 2019 : 42).

Dengan menentukan proporsi peredaman radikal bebas oleh antioksidan, aktivitas antioksidan ditentukan. Harga peredaman efektif lima puluh persen (IC_{50}), atau konsentrasi senyawa antioksidan yang dapat mengurangi aktivitas radikal bebas DPPH sebanyak lima puluh persen, dihitung dengan

menggunakan nilai persentase peredaman yang diperoleh. Aktivitas antioksidan senyawa meningkat dengan nilai IC_{50} yang lebih rendah (Nurhasnawati, Sukarni, Handayani, 2017:93-94).

2. Metode analisis ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiaz-oline-6-sulphonic acid)*)

Aktivitas antioksidan dapat diukur dengan menggunakan bahan kimia radikal kation organik ABTS. Berdasarkan waktu dan persentase deklorinasi sebagai fungsi konsentrasi, percobaan dilakukan pada pH 7,4. Pergeseran warna dari biru maupun hijau menjadi tidak berwarna merupakan indikasi aktivitas ABTS. Teknik ini menilai kapasitas antioksidan untuk menyumbangkan radikal proton untuk mencapai stabilitas. Kapasitas antioksidan pada 734 nm ditentukan secara kuantitatif dengan menggunakan kalorimeter (Risma, 2022:10).

Konsep di balik metode pengujian ABTS adalah bahwa aktivitas antioksidan yang secara langsung bereaksi dengan kation ABTS diukur dengan menghilangnya warna kation ABTS. Karena ABTS sangat peka terhadap cahaya, teknik ini memiliki kekurangan yaitu membutuhkan 12-16 jam inkubasi gelap (Setiawan, Yunita, Kurniawan, 2018:85).

3. Metode Analisis FRAP (*Ferric Reducing Ability of Plasma*)

Metode analisis FRAP uji aktivitas antioksidan sering dipakai sebagai pengukur seberapa baik antioksidan mereduksi Fe^{3+} -TPTZ yang semula memiliki warna kuning menjadi biru menjadi Fe^{2+} -TPTZ (Risma, 2022:13). Manfaat metode ini ialah kesederhanaannya, kemudahan persiapan bahan kimia yang diperlukan, dan keterjangkauan harganya (Fikey, 2020:3).

4. Metode Analisis ORAC atau HORAC (*hydroxyl Radical Activities*)

Interaksi reduksi-oksidasi antara radikal bebas dan antioksidan yang dinilai dengan melihat bagaimana antioksidan mereduksi ion cupric (Cu^{2+}) menjadi cuprous (Cu^{+}) melalui donor elektron merupakan dasar metode CUPRAC (Dontha, 2016). Reagen $Cu(II)$ -neocuproin (Cu^{2+} -(Nc)₂) digunakan dalam prosedur ini, sebagai oksidator atau agen pengkkelat (Gülçin, 2012; Maryam *et al.*, 2016). Perubahan warna menjadi kuning kecokelatan

menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Pada 450 nm, hasil reaksi reduksi ion Cu^{2+} bisa dipantau (Maryam *et al.*, 2016).

5. Metode Analisa CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Metoda CUPRAC didasarkan pada interaksi reduksi-oksidasi antara radikal bebas dengan antioksidan dinilai dengan cara antioksidan mereduksi ion cupric (Cu^{2+}) menjadi cuprous (Cu^+) melalui donor electron (Dontha, 2016). Prosedur ini memakai reagen Cu (II) *neocuproin* ($\text{Cu}^+(\text{Nc})_2$) untuk oksidator atau agen pengkkelat (Gulçin, 2012; Maryam *et al.*, 2016). Perubahan warna menjadi kuning kecokelatan menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang dapat dipantau di panjang gelombang 450 nm (Maryam *et al.*, 2016).

I. Persen Inhibisi dan Nilai IC_{50}

Nilai IC_{50} dan persen penghambatan adalah dua cara untuk mengekspresikan aktivitas antioksidan sampel. Kemampuan bahan sebagai penghambat aktivitas radikal bebas, yang berkorelasi melalui konsentrasi larutan bahan yang diuji, dapat digambarkan dengan persentase penghambatan. Dengan menggunakan spektrofotometer tampak, nilai absorbansi larutan sampel di panjang gelombang maksimum larutan kontrol DPPH dapat digunakan untuk menentukan persentase penghambatan. Jika sudah didapatkan nilai absorbansi tiap-tiap sampel, maka bisa dilakukan perhitungan nilai persen inhibisinya dengan rumus:

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

Keterangan:

- Absorbansi control adalah absorbansi larutan DPPH pada panjang gelombang maksimum (517 nm).
- Sampel absorbansi adalah absorbansi dari larutan uji atau larutan pembanding pada panjang gelombang maksimum (517 nm).

Nilai IC_{50} , atau konsentrasi yang dapat menekan 50% aktivitas radikal bebas DPPH, adalah hasil akhir dari penilaian aktivitas antioksidan sampel. Dengan membentuk persamaan garis yang mengaitkan persen penghambatan dengan konsentrasi yang berbeda dari larutan uji dan larutan pembanding,

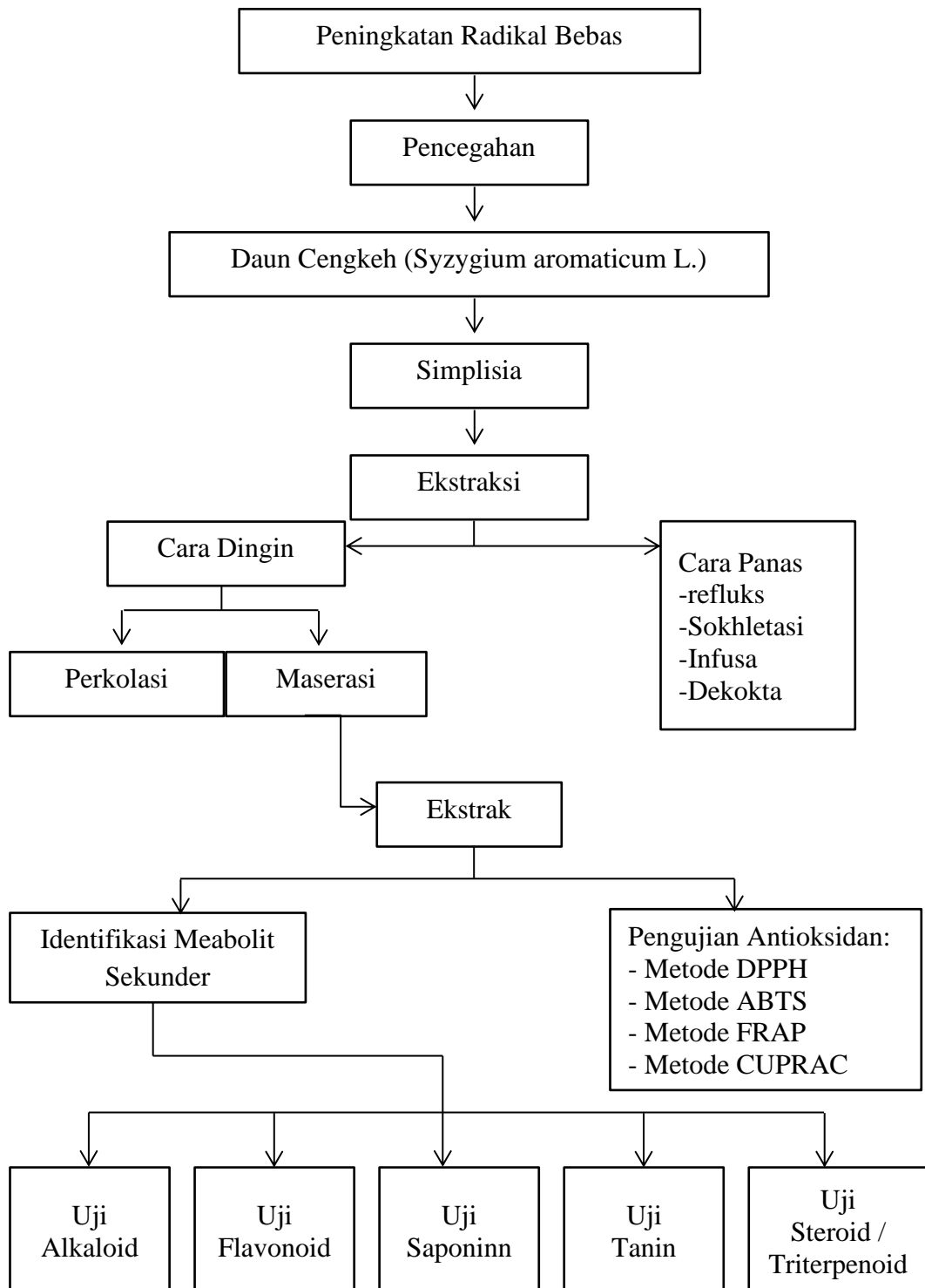
seperti quercetin, nilai IC_{50} ditentukan. Presentase inhibisi dihitung dengan rumus:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

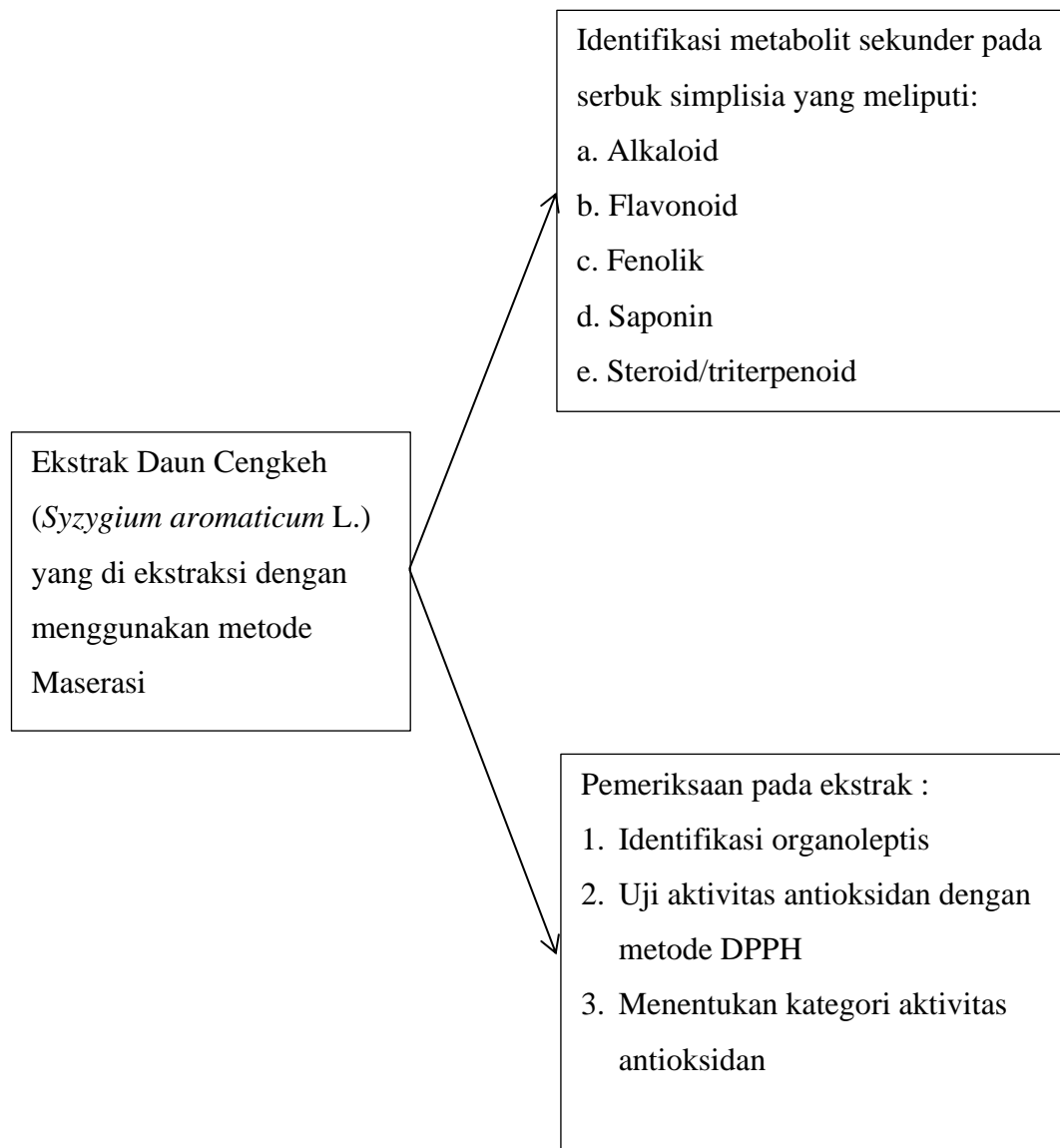
- $Y = 50$
- $X = \text{Konsentrasi larutan Uji (K)}$

J. Kerangka Teori



Sumber : Marjoni (2016)

Gambar 2.2 Kerangka Teori.

K. Kerangka Konsep

Gambar 2.3 Kerangka Konsep.

L. Definisi Operasional

Tabel 2.1 Definisi Operasional

Variable Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Skor
Sifat organoleptis ekstrak daun cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)					
1. Warna	Penilaian visual peneliti terhadap ekstrak daun cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Observasi	Indra Penglihatan	warna : 1 = Hijau Kecoklatan 2 = Hijau 3 = Coklat 4 = Merah Kecoklatan	Nominal
2. Bau	Aroma yang diterima peneliti dengan indra penciuman terhadap bau yang ditimbulkan dari ekstrak daun cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Observasi	Indra Penciuman	1 = bau khas cengkeh 2 = tidak bau khas cengkeh	Nominal
3. Konsistensi	Konsistensi dari ekstrak daun cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	Observasi	Indra Peraba	1 = Konsisten 2 = Tidak Konsisten	Ordinal
Profil Metabolit Sekunder					
Senyawa Favonoid	Senyawa yang pada lapisan amil alkohol membentuk warna merah, kuning maupun jingga (Marjoni,2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk warna jingga, kuning atau merah pada lapisan amil alkohol (-) tidak terbentuk warna jingga, kuning atau merah pada lapisan amil alkohol	Nominal

Variable Penelitian	Definisi Operasional	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Skor
Senyawa Saponin	Senyawa yang setelah penambahan larutan HCL 2N terbentuk buih (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk buih pada sampel (-) tidak berbentuk buih pada sampel	Nominal
Senyawa alkaloid	Senyawa yang setelah penambahan pereaksi dragendrof, baucharat, dan mayer terbentuk endapan (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk endapan pada minimal dua sampel (-) tidak terbentuk endapan pada minimal dua sampel	Nominal
Senyawa fenolik	Senyawa yang setelah penambahan pereaksi FeCl ₃ terbentuk warna biru hingga kehitaman (Marjoni, 2016)	Observasi	Indera penglihatan	(+) terbentuk warna biru hingga kehitaman pada sampel (-) tidak terbentuk warna biru hingga kehitaman pada sampel	Nominal
Identifikasi Pada Ekstrak					
Aktivitas Antioksidan	Konsentrasi yang bisa mencegah aktivitas radikal bebas DPPH sebesar 50%.	Observasi	Spektrofotometer	Nilai IC ₅₀ (ppm)	Rasio
Kategori aktivitas antioksidan	Tingkat kekuatan aktivitas antioksidan dengan melihat besarnya nilai IC ₅₀	Observasi	Perbandingan dengan parameter IC ₅₀	1=Sangat kuat (IC ₅₀ :<50 ppm) 2=Kuat (IC ₅₀ :50- 100 ppm) 3=Sedang (IC ₅₀ :101-150 ppm) 4=Lemah (IC ₅₀ :151- 200 ppm) 5=Tidak Aktif (IC ₅₀ :>500 ppm)	Ordinal