

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Stres Oksidatif dan Radikal Bebas

Stres oksidatif merupakan faktor utama yang berkontribusi terhadap berbagai penyakit, termasuk obesitas, diabetes, kanker, penyakit kardiovaskular, stroke, dan penyakit neurodegeneratif. Kondisi ini terjadi akibat ketidakseimbangan antara zat antioksidan dan zat oksidan di dalam tubuh, yang sering kali dipicu oleh radikal bebas. Radikal bebas ini bisa berasal dari luar tubuh (faktor lingkungan) maupun dihasilkan secara internal melalui proses metabolisme seluler dalam keadaan normal. (Sunarti, 2021:1)

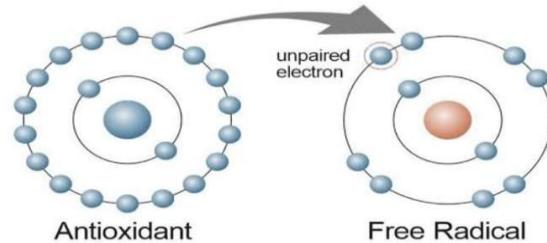
Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif, disebabkan oleh adanya satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbital terluarnya (Pangkahila, 2007 dalam Irianti; dkk, 2021:3). Untuk mencapai stabilitas, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk mendapatkan pasangan elektron (Rohman, 2006 dalam Irianti; dkk, 2021:3). Keberadaan elektron yang tidak berpasangan ini membuat radikal bebas secara kimiawi menjadi sangat aktif. (Irianti; dkk, 2021:3). Oleh karena itu, untuk menetralkan radikal bebas, dibutuhkan antioksidan (Ramadani, 2010).

B. Antioksidan

Senyawa antioksidan, secara kimia, dapat didefinisikan sebagai senyawa yang berfungsi sebagai donor elektron. Dalam konteks biologis, antioksidan mencakup berbagai senyawa yang dapat mengurangi efek negatif oksidan, termasuk enzim dan protein yang mengikat logam. Fungsi utama antioksidan adalah mendonorkan elektronnya kepada senyawa oksidan, yang berujung pada penghambatan aktivitas oksidan tersebut (Winarti, 2010 dalam Irianti; dkk, 2021:70). Antioksidan diperlukan tubuh untuk melindungi dari serangan radikal bebas. Meskipun hadir dalam konsentrasi rendah, antioksidan mampu secara efektif menghambat atau mencegah oksidasi substrat dalam reaksi berantai (Irianti; dkk, 2021:70). Dengan memberikan elektron kepada molekul radikal bebas, antioksidan membantu

menstabilkan radikal tersebut dan menghentikan reaksi berantai yang dapat merusak sel (Irianti; dkk, 2021:70).

Antioksidan dapat menghambat pembentukan radikal bebas di dalam tubuh, seperti yang terlihat pada gambar.



Gambar 2. 1 Molekul Antioksidan

Sumber: <https://sl.bing.net/iSePZW8XnMG>

1. Jenis Antioksidan

a. Antioksidan Alami

Antioksidan alami dapat diambil dari sumber-sumber alami. Senyawa ini memiliki bobot molekul sekitar 200-400 dan mudah diserap oleh usus untuk didistribusikan ke seluruh tubuh. Fungsi utama dari antioksidan alami meliputi sebagai reduktor, penghambat pembentukan oksigen singlet, penangkap radikal bebas, dan pengikat logam (Irianti; dkk, 2021:72). Antioksidan alami dibedakan menjadi enzim dan vitamin. Enzim antioksidan yang diproduksi tubuh termasuk superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase, dan katalase, sedangkan antioksidan vitamin biasanya berupa beta karoten (vitamin A), alfa-tokoferol (vitamin E), dan asam askorbat (vitamin C) (Irianti; dkk, 2021:72). Antioksidan yang berasal dari tumbuhan mencakup senyawa polifenol atau fenolik, flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam organik (Irianti; dkk, 2021:72).

b. Antioksidan Sintetik

Senyawa antioksidan sintetis berfungsi untuk menangkap radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai (Hurrell, 2003 dalam Irianti; dkk, 2021:83). Contoh antioksidan sintetis termasuk Butylated hydroxyl anisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Propyl gallate (PG), agen pengikat logam (EDTA), Tertiary butyl hydroquinone (TBHQ), dan Nordihydroguaiaretic acid (NDGA). Antioksidan utama yang digunakan dalam produk makanan saat ini adalah senyawa fenolik monohidroksi atau polihidroksi dengan berbagai substituen pada struktur cincin

(Irianti; dkk, 2021:83). Untuk meningkatkan kelarutannya dalam lemak dan minyak, senyawa fenolik sintetis sering dimodifikasi dengan alkil (Irianti; dkk, 2021:83).

C. Tanaman Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*)



Gambar 2. 2 Tanaman Pandan Wangi

Sumber: Dokumentasi Pribadi

1. Klasifikasi Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*)

Menurut Plantamor, klasifikasi Pandan Wangi (*P. amaryllifolius*) adalah sebagai berikut:

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Magnoliophyta
Kelas	:	Liliopsida
Ordo	:	Pandanales
Famili	:	Pandanaceae
Genus	:	Pandanus
Species	:	<i>Pandanus amaryllifolius Roxb.</i>

2. Morfologi Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius Roxb.*)

Daun pandan adalah daun *Pandanus amaryllifolius Roxb.*, suku Pandanaceae. Pemerian: Bau khas aromatik, tidak berasa.

Makroskopik: Helaian daun tunggal, liat, umumnya tidak utuh, warna hijau tua, bentuk garis, panjang 48,2 cm sampai 50,3 cm, lebar 3,5 cm sampai 4,0 cm, ujung daun lancip, pinggir daun sedikit berduri kecil-kecil, tidak bertangkai, tulang daun

sejajar. Permukaan daun yang atas lebih mengkilap dari pada permukaan daun yang bawah.

Mikroskopik: Pada penampang melintang melalui tulang daun tampak epidermis atas terdiri dari 1 lapis sel berbentuk empat persegi panjang, kutikula tipis, stomata sedikit, di bawah epidermis atas terdapat hipodermis terdiri dari 2 lapis sel berbentuk empat persegi panjang. Epidermis bawah terdiri dari 1 lapis sel berbentuk empat persegi panjang, kutikula tipis, stomata lebih banyak dari pada epidermis atas. Mesofil meliputi jaringan palisade yang terdiri dari 3 lapis sel, terdapat serabut tersusun terpencar, jaringan bunga karang terdiri dari sel-sel yang berdinding tipis terdapat hablur kalsium oksalat berbentuk prisma. Berkas pembuluh tipe kolateral. Pada sayatan paradermal tampak epidermis atas berbentuk empat persegi panjang dengan dinding antiklinal lurus, epidermis bawah berbentuk empat persegi panjang, stomata tipe parasitik.

Serbuk: berwarna hijau muda. Fragmen pengenal adalah epidermis atas; epidermis bawah, berkas pembuluh dengan hablur kalsium oksalat berbentuk prisma. (Depkes RI, 1985:380)

3. Manfaat Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)

Daun pandan wangi memiliki banyak khasiat, di antaranya sebagai rempah dalam pengolahan makanan, memberikan warna hijau pada masakan, serta sebagai bahan baku untuk pembuatan minyak wangi. Daun ini mengeluarkan aroma harum saat diremas atau diiris. Selain itu, daun pandan wangi juga memiliki manfaat dalam pengobatan, antara lain:

- a. Mengatasi lemah saraf
- b. Meredakan rematik dan pegal linu
- c. Menghitamkan rambut dan mengurangi kerontokan
- d. Menghilangkan ketombe
- e. Meningkatkan nafsu makan
- f. Menangani hipertensi

4. Kandungan Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)

Hasil analisis kandungan kimia daun pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius*) menunjukkan bahwa daun tanaman ini mengandung senyawa flavonoid, polifenol, tanin, saponin, minyak atsiri, dan alkaloid (Dalimarta, 2015)

Tabel 2. 1 Zat-Zat Dan Kegunaan Zat Yang Terkandung Di Dalam Daun Pandan Wangi (*Pandanus ammaryllifolius*) (Dalimarta, 2015)

Zat	Manfaat
Flavonoid	1) Sebagai antioksidan 2) Melindungi struktur sel 3) Meningkatkan efektivitas vitamin C 4) Anti inflamasi 5) Mencegah keropos tulang 6) Antibiotik 7) Antivirus 8) Menghambat penyerapan glukosa diusus
Polifenol	1) Antioksidan 2) Memperkuat sistem kekebalan tubuh 3) Meningkatkan sirkulasi darah dan meningkatkan kesehatan jantung 4) Menghambat pertumbuhan kanker 5) Memperlambat keropos pada tulang
Tanin	1) Antibakteri 2) Penawar racun 3) Anti diare 4) Antioksidan 5) Menghambat pertumbuhan tumor
Saponin	1) Antiseptik 2) Menghambat Na ⁺ / D-glucose cotransport system (SGLUT) di membran brush border intestinal
Minyak atsiri	1) Anti nyeri 2) Anti infeksi 3) Pembunih bakteri
Alkaloid	Meminimalisir racun-racun di dalam tubuh.

D. Ekstraksi

Ekstraksi atau penyarian adalah proses pemisahan senyawa dari matriks atau simplisia dengan menggunakan pelarut yang tepat. Proses ekstraksi memiliki peranan yang sangat penting dalam analisis fitokimia, karena meliputi semua tahap dari awal hingga akhir, termasuk fraksinasi dan pemurnian. (Hanani, 2017:10).

Pelarut memainkan peran yang penting dalam proses ekstraksi senyawa. Sifat polar pelarut sangat mempengaruhi cara senyawa target diekstraksi dari bahan asal. (Hakim & Saputri, 2020).

Senyawa non-polar cenderung larut dalam pelarut non-polar, sementara senyawa semi-polar akan larut dalam pelarut semi-polar, dan senyawa polar larut dalam pelarut polar. Pelarut etanol bersifat polar dan pelarut etil asetat bersifat semi polar. (Sayuti, 2017).

Etanol adalah pelarut organik yang sering digunakan dalam proses ekstraksi dan telah banyak dibahas dalam berbagai penelitian. Penggunaan etanol yang luas disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain karena etanol lebih aman dan kurang toksik dibandingkan dengan pelarut lain seperti aseton dan metanol, harganya yang terjangkau, serta kemampuannya untuk digunakan dalam berbagai metode ekstraksi. Selain itu, etanol juga aman digunakan untuk ekstrak yang akan diproses menjadi obat-obatan dan produk makanan. Etanol juga mudah diperoleh, efisien, ramah lingkungan, dan memiliki kemampuan ekstraksi yang tinggi. (Chen et al., 2020). Pemilihan pelarut dengan tingkat polaritas yang berbeda dapat mempengaruhi jumlah rendemen yang dihasilkan. (Verdiana et al., 2018).

Di bawah ini terdapat beberapa metode ekstraksi yang bisa digunakan:

1. Cara Dingin

a. Maserasi

Istilah *maceration* berasal dari bahasa Latin "*macerare*" yang berarti "merendam." Maserasi adalah proses ekstraksi yang paling tepat, di mana simplisia yang telah dihancurkan direndam dalam pelarut hingga meresap dan melunakkan struktur sel, sehingga senyawa yang mudah larut akan terlarut ke dalamnya (Ansel, 1989 dalam Arbyta, Wardani, Nurhayati: 36). Maserasi merupakan metode penyarian yang paling sederhana, dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dalam pelarut selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya, di

mana pelarut akan masuk ke dalam sel melalui dinding sel (Sudjadi, 2008 dalam Arbyta, Wardani, Nurhayati: 37).

Metode maserasi digunakan untuk mengekstraksi simplisia yang mengandung senyawa kimia yang mudah larut dalam pelarut cair, dan tidak mengandung benzoin, tiraks, atau lilin. Pada teknik maserasi, pelarut akan masuk ke dalam sel melalui dinding sel, sehingga isi sel larut akibat perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel. Larutan yang memiliki konsentrasi tinggi akan ter dorong keluar, digantikan oleh pelarut dengan konsentrasi lebih rendah melalui proses difusi. Proses ini berulang hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Selama proses maserasi, dilakukan pengadukan dan penggantian pelarut setiap hari. Setelah itu, endapan yang terbentuk dipisahkan dan filtratnya dipadatkan. (Gandjar dan Rohman, 2007 dalam Arbyta, Wardani, Nurhayati: 37)

Keuntungan dari metode ini adalah penggunaan alat yang sederhana (hanya memerlukan bejana perendam), biaya operasional yang cenderung rendah, proses yang efisien dalam penggunaan pelarut, dan tidak memerlukan pemanasan. Namun, kelemahan metode ini adalah proses ekstraksinya tidak sepenuhnya efektif, karena hanya sekitar 50% zat aktif yang dapat terekstraksi, serta prosesnya yang memakan waktu cukup lama, yakni beberapa hari. (Kusmardiyan dan Nawawi, 1992 dalam Arbyta, Wardani, Nurhayati: 37)

b. Perkolasi

Perkolasi adalah metode ekstraksi simplisia yang menggunakan pelarut baru secara terus-menerus, dengan cara mengalirkan pelarut melalui simplisia hingga senyawa terambil secara optimal. Metode ini memerlukan waktu yang lebih lama dan jumlah pelarut yang lebih banyak. Untuk memastikan bahwa proses perkolasai telah mencapai kesempurnaan, perkola dapat diuji keberadaan metabolit dengan menggunakan pereaksi yang spesifik. (Hanani, 2017:11).

2. Cara Panas

a. Refluks

Refluks adalah metode ekstraksi menggunakan pelarut pada suhu titik didihnya selama periode tertentu, dengan jumlah pelarut yang relatif konstan dan menggunakan pendingin balik. Untuk meningkatkan hasil ekstraksi agar lebih

optimal, refluks biasanya dilakukan berulang kali (3-6 kali) pada residu pertama. Metode ini memungkinkan terjadinya penguraian senyawa yang tidak tahan terhadap panas. (Hanani, 2017:11).

b. Soxhletasi

Soxhletasi adalah metode ekstraksi yang menggunakan pelarut organik pada suhu didih dengan alat Soxhlet. Dalam proses ini, simplisia dan ekstrak berada dalam labu yang terpisah. Pemanasan menyebabkan pelarut menguap, dan uap tersebut masuk ke dalam labu pendingin. Hasil kondensasi jatuh kembali ke bagian simplisia, sehingga ekstraksi berlangsung secara terus-menerus dengan jumlah pelarut yang relatif konstan. Metode ekstraksi ini juga dikenal sebagai ekstraksi berkelanjutan. (Hanani, 2017:11).

c. Infusa

Infusa adalah metode ekstraksi yang menggunakan pelarut air pada suhu 96-98 °C selama 15-20 menit (dihitung setelah suhu 96 °C tercapai). Bejana infusa diletakkan dalam tangki air. Metode ini cocok untuk simplisia yang bersifat lunak, seperti bunga dan daun. (Hanani, 2017:13)

d. Dekokta

Dekokta adalah metode ekstraksi yang serupa dengan infusa, namun dengan waktu ekstraksi yang lebih lama, yaitu sekitar 30 menit, dan suhunya mencapai titik didih air. (Hanani, 2017:13).

e. Destilasi

Destilasi adalah metode ekstraksi yang digunakan untuk mengambil atau menyaring senyawa yang dapat menguap bersama air sebagai pelarut. Dalam proses pendinginan, senyawa dan uap air akan terkondensasi dan terpisah menjadi destilat air dan senyawa yang diekstraksi. Metode ini sering digunakan untuk memperoleh minyak atsiri dari tumbuhan. (Hanani, 2017:13)

E. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah metode yang digunakan untuk menganalisis komponen senyawa aktif yang terdapat pada sampel, termasuk struktur kimia, biosintesis, penyebaran alami, serta fungsi biologisnya. Metode ini juga meliputi isolasi dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari berbagai jenis tanaman.

Faktor-faktor seperti letak geografis, suhu, iklim, dan kesuburan tanah suatu wilayah sangat mempengaruhi kandungan senyawa kimia dalam tanaman. Sampel tanaman yang digunakan dalam uji fitokimia dapat berupa daun, batang, buah, bunga, dan akar, yang memiliki khasiat sebagai obat dan digunakan sebagai bahan baku dalam pembuatan obat modern maupun tradisional (Agustina, dkk. 2016).

1. Alkaloid

Senyawa alkaloid dalam tumbuhan umumnya berbentuk garam, yaitu berikatan dengan asam-asam organik yang terdapat dalam tumbuhan, seperti asam suksinat, maleat, dan mekonat. Dalam bentuk basa, senyawa ini lebih larut dalam pelarut nonpolar seperti eter, benzena, toluen, dan kloroform. Sifat kelarutan senyawa ini digunakan sebagai dasar ekstraksi dari suatu simplisia. (Hanani, 2020:135).

Sejak abad ke-19, ribuan senyawa alkaloid telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi dari berbagai tumbuhan. Senyawa pertama yang ditemukan adalah morfin pada tahun 1805 oleh Serturner, diikuti oleh emetin yang diidentifikasi oleh Pelletierin pada tahun 1817. Penemuan ini berlanjut dengan penemuan alkaloid lainnya, seperti striknin (1817), kuinin (1827), piperin (1827), kafein (1819), nikotin (1829), hiosiamin (1833), atropin (1833), dan papaverin (1848). (Hanani, 2017:136-137).

2. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur dasar C₆-C₃-C₆, yang terdiri dari dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh tiga atom karbon, biasanya dengan ikatan heterosiklik yang melibatkan oksigen. Senyawa ini termasuk dalam kategori polifenol karena mengandung dua atau lebih gugus hidroksil, bersifat sedikit asam, dan dapat larut dalam basa. Umumnya, flavonoid ditemukan dalam bentuk terikat dengan gula, membentuk glikosida yang membuatnya lebih mudah larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, butanol, dan etil asetat. Glikosida biasanya memiliki warna yang lebih pucat dibandingkan bentuk aglikon. Di sisi lain, bentuk aglikon cenderung kurang polar dan lebih mudah larut dalam pelarut seperti kloroform dan eter. (Hanani, 2017:103).

Banyak flavonoid berfungsi sebagai pigmen berwarna yang menarik serangga untuk membantu proses penyerbukan, serta menarik hewan lain, seperti burung, untuk membantu penyebaran biji. Golongan flavon berfungsi mirip dengan auksin dalam merangsang perkecambahan biji gandum, berperan sebagai pengatur pertumbuhan, dan menghambat respirasi serta proses fotofosforilasi, fosfodiesterase, aldose reduktase, prolil-hidroksilase, dan lipokksigenase.

Pada dosis kecil, flavon bertindak sebagai stimulan jantung. Flavon yang terhidroksilasi memiliki efek diuretik dan bertindak sebagai antioksidan pada lemak. Beberapa isoflavon menunjukkan aktivitas yang dapat menurunkan kadar kolesterol serum. Hesperidin memiliki efek positif terhadap pembuluh darah kapiler dan berfungsi sebagai antimikroba. (Hanani, 2017:106).

Flavonoid adalah kelompok senyawa fenolik yang memiliki kemampuan antioksidan yang kuat. Fungsi flavonoid sebagai antioksidan melibatkan penangkapan radikal bebas yang tidak stabil dengan cara menyumbangkan elektron. Selain itu, flavonoid dapat mencegah radikal bebas dengan menghambat atau menstabilkan spesies reaktif oksigen (ROS) melalui penghilangan senyawa pengoksidasi, termasuk xenobiotik. Dalam proses ini, flavonoid juga mengaktifkan jalur sinyal enzim endogen seperti SOD, Katalase, dan GPx, sehingga mencegah pembentukan hidrogen peroksida (H_2O_2) dan radikal hidroksil (OH). (Husna et al., 2022) .

3. Tanin

Istilah "tanin" diperkenalkan pada tahun 1796 oleh Seguin, ketika ditemukan bahwa ekstrak tanaman mengandung senyawa yang dapat bereaksi dengan protein. Tanin biasanya berbentuk amorf, yang dapat membentuk koloid dalam air, memiliki rasa sepat, dan dapat membentuk endapan dengan protein yang menghambat aktivitas enzim proteolitik. Bobot molekul tanin umumnya di atas 1000, sedangkan senyawa dengan bobot molekul di bawah 1000 sering disebut "pseudotanin," contohnya asam galat, katekin, dan asam klorogenat. Terdapat dua jenis tanin dalam tumbuhan: tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi, yang juga dikenal sebagai proantosianidin. (Hanani, 2017: 79-80).

Sifat astringen tanin dapat dimanfaatkan untuk mengatasi diare, menghentikan perdarahan, dan mencegah peradangan, khususnya pada mukosa mulut, serta digunakan sebagai antidot pada keracunan logam berat dan alkaloid. Tanin juga memiliki fungsi antiseptik berkat adanya gugus fenol. Dalam praktik Ayurveda, tanaman yang kaya tanin digunakan untuk berbagai penyakit, seperti leukorea, rinorea, dan diare, serta sering dipadukan dengan tanaman lain. (Hanani, 2017:80).

4. Saponin

Istilah "saponin" diambil dari tanaman *Saponaria vaccaria*, yang dapat digunakan sebagai sabun dan mengandung saponin. Saponin larut dalam air, tidak larut dalam eter, dan dapat terhidrolisis menjadi aglikon. Saponin adalah senyawa dengan bobot molekul tinggi yang ditemukan dalam beberapa tumbuhan, terdiri dari glikosida dengan molekul gula yang terikat pada aglikon triterpen atau steroid. Molekul gula umumnya terikat pada gugus OH, terutama di posisi C-3, atau pada dua gugus OH, atau satu gugus OH dan satu gugus COOH. Beberapa triterpen memiliki rasa pahit, seperti limonin yang terdapat pada kulit buah jeruk, kukurbitasin pada biji labu merah, sementara glisirizin yang terdapat pada akar manis memiliki rasa manis. (Hanani, 2017: 227-228)

Saponin dibagi menjadi dua kelompok: saponin steroid dan saponin triterpen. Senyawa ini bersifat racun karena dapat menyebabkan hemolisik darah. Namun, beberapa saponin memiliki efek terapeutik, seperti yang ditemukan pada tanaman *Digitalis purpurea*, yang berpengaruh positif terhadap jantung dan sering disebut sebagai glikosida jantung, serta memiliki khasiat hipolipidemik dan potensi antikanker. (Hanani, 2017: 228)

5. Terpenoid

Istilah "terpen" berasal dari kata Jerman "terpentin" atau bahasa Inggris "turpentine." Nama ini diberikan oleh Kekule, yang menggunakan istilah tersebut untuk menyebut kelompok hidrokarbon $C_{10}H_{16}$, sebagai pengganti istilah "terebene." Seiring berkembangnya ilmu pengetahuan, istilah terpen diperluas untuk mencakup senyawa dengan rumus yang memiliki unit kimia C_5H_8 . Saat ini, senyawa terpenoid lebih dikenal sebagai kelompok senyawa kimia yang memiliki

kesamaan biosintesis, yaitu berasal dari senyawa isopren (C_2H_2), meskipun pada akhirnya terungkap bahwa senyawa yang berfungsi sebagai prekursor dalam proses *in vivo* adalah isopentenil pirofosfat. Berbagai jenis terpen memiliki sifat yang berbeda: monoterpen mudah menguap, diterpen lebih sulit menguap, dan senyawa triterpen serta sterol cenderung sulit menguap. Penggolongan senyawa terpen dilakukan berdasarkan jumlah unit isopren yang membentuknya. Umumnya, senyawa terpenoid diekstraksi dari simplisia tumbuhan menggunakan pelarut nonpolar seperti eter, heksana, atau kloroform, sementara dalam bentuk glikosida (terutama dari triterpen), kelarutannya lebih baik dalam pelarut polar seperti etanol atau metanol. Dalam proses ekstraksi dan isolasi, penting untuk memperhatikan kemungkinan mendapatkan kedua bentuk isomer senyawa terpen, seperti nerol dan geraniol. (Hanani, 2017: 191-192)

F. Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan

Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan pada tanaman dapat dilakukan dengan beberapa metode yaitu:

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

Metode DPPH menggunakan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsip kerjanya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari senyawa antioksidan seperti Fenol dan Flavonoid. (Yuslianti, 2022 : 24)

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) adalah radikal stabil yang dapat bereaksi dengan radikal lain, menghasilkan senyawa stabil, atau bereaksi dengan atom hidrogen dari antioksidan, menghasilkan DPPH tereduksi (DPPH-H). Dalam metode ini, DPPH yang telah stabil berkat pengaruh antioksidan yang diuji diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Nilai absorbansi yang terukur akan menunjukkan penurunan dibandingkan blanko akibat reduksi oleh antioksidan (AH) atau reaksi dengan radikal (R), yang berperan dalam mekanisme pemutusan rantai autooksidasi. (Yuslianti, 2022 : 24)

Berikut reaksi yang umum terjadi.



Cara kerjanya DPPH akan memberikan reaksi dengan dua cara yakni mekanisme donor atom hidrogen dan donor elektron, dimana DPPH yang bersifat radikal akan mengambil atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron.(Nugraheni et al., 2024)

Larutan DPPH memiliki warna ungu, sementara DPPH tereduksi tidak menunjukkan absorpsi maksimum pada panjang gelombang cahaya tampak. Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi inhibisi suatu senyawa, semakin pudar warna ungu yang terbentuk. Konsentrasi inhibisi dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\text{Konsentrasi \% inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi ekstrak}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Reaksi cepat DPPH berlangsung dengan beberapa jenis senyawa fenolik, seperti a-tocopherol. Meskipun reaksi sekunder yang lebih lambat juga dapat terjadi dan memengaruhi penurunan absorbansi, kondisi steady state biasanya hanya tercapai dalam waktu beberapa jam. Oleh karena itu, laporan mengenai uji kapasitas antioksidan menggunakan DPPH umumnya mencakup reaksi oksidasi yang terjadi dalam rentang waktu 10-15 menit. Data ini biasanya disebut IC₅₀, yaitu konsentrasi antioksidan yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal DPPH. (Yuslianti, 2022 : 24-25)

Parameter yang digunakan untuk menentukan aktivitas penangkapan radikal bebas adalah IC₅₀, yang memungkinkan pengklasifikasian kekuatan antioksidan sebagai berikut:

Tabel 2. 2 Parameter Aktivitas Penangkap Radikal Bebas
(Yuslianti, 2022 : 25)

Intensitas	Nilai IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Sangat kuat	<50
Kuat	50-100
Sedang	101-250
Lemah	250-500
Sangat lemah	>500

2. Metode HPLC-ABTS

ABTS adalah senyawa radikal kation organik yang digunakan untuk mengukur aktivitas antioksidan pada pH 7,4 yang diukur berdasarkan waktu dan persentase

perubahan warna sebagai indikator konsentrasinya. Aktivitas ABTS dapat dilihat dari perubahan warna yang terjadi, yaitu dari biru atau hijau menjadi tidak berwarna. (Aderiyanti, 2022:10)

Prinsip dasar pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS adalah dengan menghilangkan warna dari kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang bereaksi langsung dengan radikal kation ABTS. ABTS adalah radikal yang memiliki pusat nitrogen dan menunjukkan warna biru-hijau, yang ketika direduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk non-radikal, dari yang berwarna menjadi tidak berwarna. Metode ABTS sangat peka terhadap cahaya, sehingga pembentukan ABTS^{•-} memerlukan waktu inkubasi 12-16 jam dalam kondisi gelap. (Aderiyanti, 2022:12)

3. Metode HPLC-FRAP

FRAP adalah metode analisis yang umum digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam mereduksi Fe(III)-TPTZ menjadi Fe(II)-TPTZ, yang disertai dengan perubahan warna dari kuning menjadi biru. (Aderiyanti, 2022:12)

4. Metode HPLC-CUPRAC

Dalam pengujian antioksidan menggunakan metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), kompleks bis-neokuproin-tembaga(II) akan mengoksidasi senyawa antioksidan dalam ekstrak tanaman dan tereduksi membentuk kompleks bis-neokuproin-tembaga(I). Perubahan ini dapat diamati secara visual melalui perubahan warna kompleks larutan dari biru menjadi kuning. (Haeria, Tahar, Munadiah, 2018:95).

G. Spektrofotometri

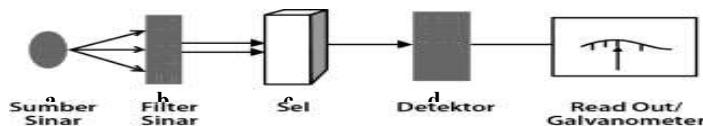
Spektrofotometri merupakan metode analisis yang mengukur penyerapan cahaya monokromatik oleh larutan berwarna pada panjang gelombang tertentu, menggunakan kisi difraksi dan detektor tabung foto atau prisma monokromator. Teknik ini merupakan analisis penyerapan energi yang lebih mendalam dan dapat dianggap sebagai pengembangan dari pemeriksaan visual. Penyerapan radiasi oleh suatu sampel dianalisis pada berbagai panjang gelombang, kemudian data tersebut

diproses melalui perangkat untuk memperoleh spektrum yang berbeda dari setiap komponen. (Khopkar,1990).

Spektrofotometer berfungsi untuk mengukur jumlah energi yang diserap atau diteruskan. Ketika radiasi monokromatik melewati larutan yang mengandung zat penyerap, sebagian radiasi tersebut akan dipantulkan, diserap oleh zat, dan sisanya akan ditransmisikan.

Lambert dan Beer telah secara empirik mengembangkan hubungan antara intensitas cahaya yang ditransmisikan dengan ketebalan larutan, serta hubungan antara intensitas tersebut dan konsentrasi zat, yang dirumuskan dalam hukum Lambert-Beer. (Harmita, 2017: 85).

Spektrofotometri serapan ultraviolet-cahaya tampak (UV-Vis) digunakan untuk mengukur serapan atau transmisi, yang bertujuan untuk menganalisis spesies kimia baik dari segi kualitatif maupun kuantitatif. (Khopkar,1990).



Gambar 2. 3 Instrumen spektrofotometri

Sumber: (Zackiyah, 2016)

a. Sumber Sinar

Sumber cahaya yang umum digunakan adalah lampu kawat wolfram (lampu filamen tungsten). (Zackiyah, 2016) Berikut adalah syarat-syarat yang harus dipenuhi oleh sumber cahaya:

- Memiliki intensitas yang cukup tinggi agar dapat dideteksi oleh detektor dan diukur oleh meter.
- Mampu memancarkan cahaya secara kontinu, yang berarti harus mencakup semua panjang gelombang dalam spektrum yang diinginkan.
- Stabil, dengan intensitas yang tetap selama periode waktu yang dibutuhkan.

b. Filter

Filter ini digunakan untuk mengisolasi bagian spektrum yang diinginkan. Cairan yang terlihat merah karena meneruskan cahaya merah dari spektrum, tapi menyerap bagian spektrum yang berwarna hijau kebiruan (warna komplemen

merah). Oleh karena itu, untuk mengukur cairan berwarna merah, diperlukan filter hijau kebiruan, yang merupakan warna komplemen dari cairan yang diukur. (Zackiyah, 2016)

Tabel 2. 3 Warna-warna Komplemen

Nm	Warna	Warna komplemen
<400	UV	
400-500	Ungu	Hijau-Kuning
450-500	Biru	Kuning
500-570	Biru-Hijau	Jingga
570-590	Kuning	Biru
590-620	Jingga	Biru-Hijau
620-750	Merah	Hijau-Biru

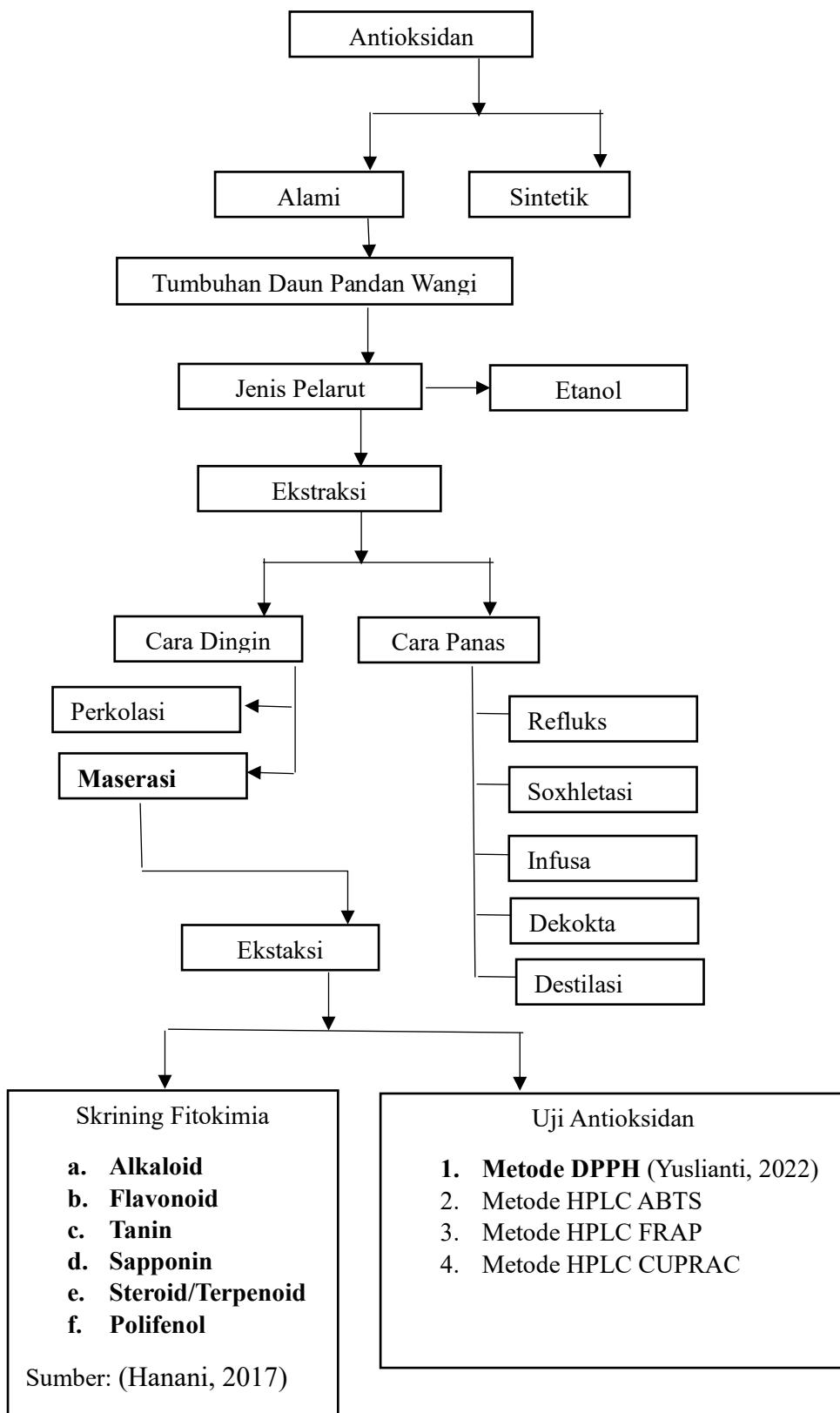
c. Sel tempat larutan (cuvet)

Larutan yang akan dianalisis diletakkan dalam wadah yang disebut cuvet. Cuvet ini dapat berbentuk persegi atau silinder, mirip dengan tabung reaksi. Ketebalan sel cuvet berkisar antara 0,1 hingga 10 cm, dengan yang paling umum digunakan memiliki ketebalan 1 cm. (Zackiyah, 2016)

d. Detektor

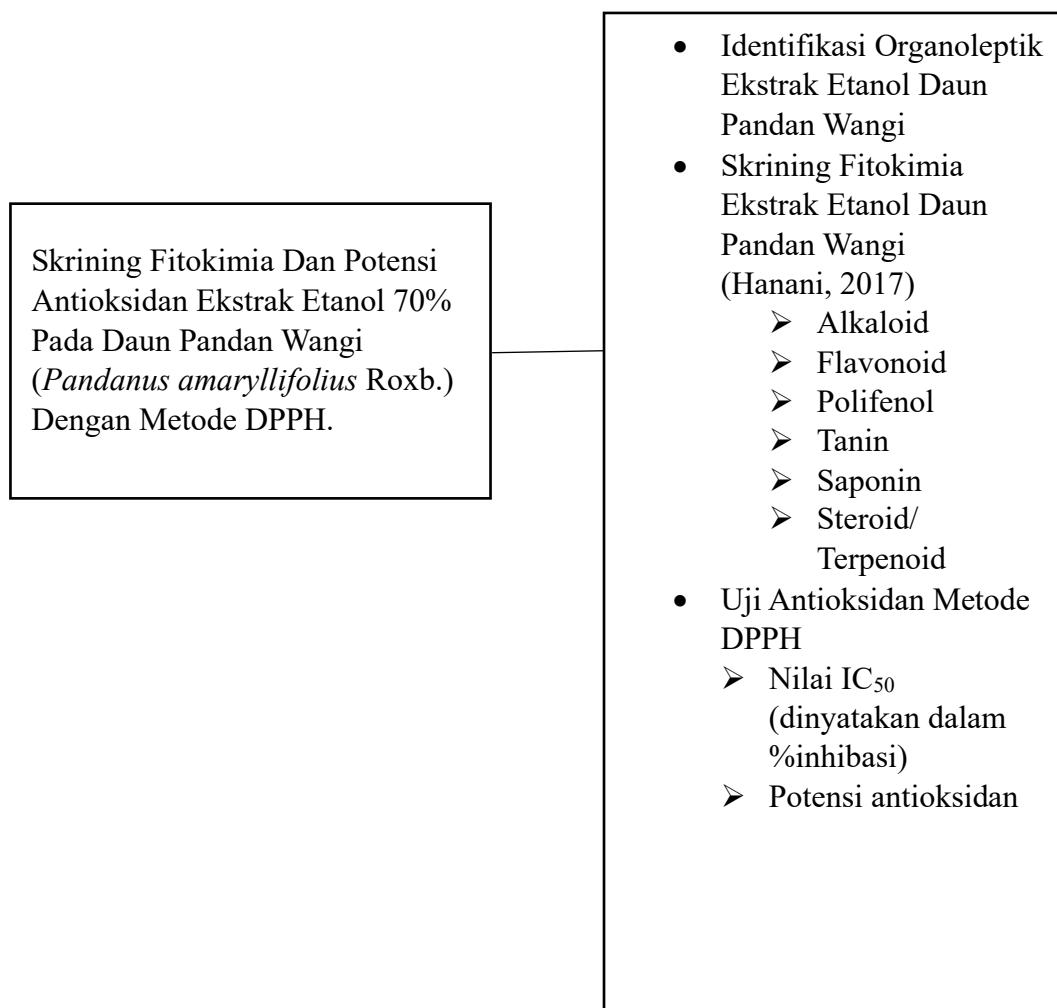
Detektor yang umum digunakan dalam fotometer filter adalah fotosel. Fotosel ini terdiri dari pelat logam (Fe) yang dilapisi dengan bahan semikonduktor (Se). Pada permukaan semikonduktor tersebut, diaplikasikan lapisan tipis dan tembus cahaya dari logam Ag. Lapisan Ag ini berfungsi sebagai elektroda pengumpul (-), sementara pelat logam berfungsi sebagai elektroda kedua (+). (Zackiyah, 2016)

H. Kerangka Teori



Gambar 2. 4 Kerangka Teori

I. Kerangka Konsep



Gambar 2. 5 Kerangka Konsep

J. Definisi Operasional

Tabel 2. 4 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
Sifat organoleptis dari ekstrak etanol 70% daun pandan wangi (<i>pandanus ammaryllifolius Roxb.</i>)	Sebagai pengantar awal yang sederhana, dengan mendeskripsikan bentuk, warna, dan aroma (Depkes RI, 2000:31).	Observasi	Panca indra - Indera peraba - Indera penglihatan - Indera penciuman	Konsistensi dari ekstrak, warna, dan aroma.	Nominal
Skrining Fitokimia					
a. Senyawa Alkaloid	Senyawa yang membentuk endapan setelah ditambahkan pereaksi Dragendorff, Bauchart, dan Mayer (Marjoni, 2016).	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk endapan pada pada minimal dua sampel	Nominal
b. Senyawa Flavonoid	Senyawa yang menghasilkan warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Marjoni, 2016).	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk warna jingga, kuning, atau merah pada lapisan amil alkohol	Nominal
c. Senyawa Tanin	Senyawa yang teridentifikasi jika menghasilkan endapan setelah penambahan gelatin 1% dalam NaCl 10 % (Hanani, 2015).	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk endapan	Nominal
d. Senyawa Saponin	Senyawa yang menghasilkan buih setelah penambahan larutan HCl 2 N (Marjoni, 2016).	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk buih pada sampel	Nominal
e. Senyawa Steroid/ Triterpenoid	yang menghasilkan warna biru hingga hijau atau warna merah hingga ungu setelah	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk warna merah hingga ungu atau biru hingga hijau	Nominal

Variabel Penelitian	Definisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala
penambahan pereaksi Senyawa Lieberman Burchard (Marjoni, 2016).					
f. Fenol	Senyawa yang menghasilkan warna biru hingga kehitaman setelah penambahan pereaksi FeCl ₃ (Marjoni, 2016).	Observasi	Indra Penglihatan	Terbentuk warna biru hingga kehitaman	Nominal
Potensi antioksidan	Tingkat kekuatan aktivitas antioksidan dengan melihat besarnya nilai IC ₅₀	Observasi	Perbandingan dengan parameter IC ₅₀	1=sangat kuat 2=kuat 3=sedang 4= lemah 5=tidak aktif	Rasio