

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Marigold (*Tagetes erecta* Linn.)

1. Definisi marigold (*Tagetes erecta* Linn.)

Bunga (*Tagetes erecta* Linn.) merupakan tanaman dari famili *Asteraceae* yang tersebar di seluruh dunia dengan berbagai jenis dan sering digunakan sebagai tanaman hias. Bunga (*Tagetes erecta* Linn.) diketahui mengandung senyawa karotenoid, seperti lutein, beta-karoten, alfa-karoten, zeaxanthin, anthraxanthin dan alpha-cryptoxanthin. Bunga kuning dianggap tinggi lutein karena lutein adalah pigmen kuning, tetapi senyawa karotenoid pada tanaman sebagian besar adalah ester karotenoid (Susanti dan Hanif, 2018).

Marigold merupakan salah satu tanaman hias jenis marigold yang potensial untuk diproduksi karena memiliki manfaat yang berbeda di berbagai daerah. Di sektor pertanian, tanaman ini berfungsi sebagai agen biologis untuk menarik hewan pembasmi hama dan bidang pencarian di sektor transportasi (Wahyu, 2019). Menurut Sucipto (2014), (*Tagetes erecta* Linn.) tidak populer di dalam negeri karena baunya yang tidak sedap dari tanamannya, namun karena memiliki bau yang tidak sedap maka tanaman marigold bermanfaat sebagai tanaman pengusir serangga. Di Bali, (*Tagetes erecta* Linn.) terkenal karena digunakan sebagai bunga utama dalam upacara keagamaan dan sesajen sehari-hari (Hanifah, 2022).

Marigold adalah tanaman kuat bercabang, asli Meksiko dan bagian Amerika lainnya yang lebih hangat dan dinetralkan di tempat lain di daerah tropis dan subtropis termasuk India dan Bangladesh (Singh dkk., 2020). Secara historis,

marigold telah digunakan di seluruh India, Cina, dan Indonesia sebagai bumbu dan bahan obat (Rajvanshi dan Dwivedi, 2017).

Marigold merupakan tumbuhan yang tumbuh di liar dan memiliki mahkota bunga yang cerah serta memiliki manfaat sebagai kemopreventif karena memiliki senyawa antioksidan pencegah radikal bebas. Radikal bebas dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti penyakit jantung dan kanker (Susanti dan Hanif, 2018).

Marigold dapat berperan sebagai tempat perlindungan mikrohabitat bagi banyak spesies musuh serangga alami karena memiliki bunga yang dapat menarik musuh serangga. Marigold adalah jenis bunga cerah yang dapat menarik serangga musuh alami. Dan karena bunga marigold juga berfungsi sebagai pencegah serangga dan musuh alami, maka bunga marigold jarang didatangi serangga, hanya beberapa jenis serangga, termasuk lebah dan kupu-kupu. Lebah bekerja sebagai musuh alami bagi beberapa hama sekaligus penyerbuk terpenting karena kemampuannya mengumpulkan serbuk sari dan nektar dalam jumlah banyak dan makan bersama di daerahnya (Susanti dan Hanif, 2018).



Sumber: dokumentasi pribadi

Gambar 1: Tanaman Marigold (*Tagetes erecta* Linn.)

2. Klasifikasi marigold (*Tagetes erecta* Linn.)

Berdasarkan taksonomi tanaman Marigold (*Tagetes erecta* Linn.) dapat digolongkan sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Ordo : *Asterales*

Famili : *Asteraceae*

Genus : *Tagetes*

Spesies : *Tagetes erecta* L. (Print dkk., 2015)

3. Morfologi marigold (*Tagetes erecta* Linn.)

Marigold adalah ramuan tahunan yang kuat yang berasal dari Eropa Selatan, yang juga dapat ditemukan tumbuh di sebagian besar daerah beriklim sedang di dunia. Tingginya mencapai 50-80 cm, daunnya berwarna hijau tua, panjangnya antara 5 dan 17 cm. Daun dan batangnya ditutupi bulu-bulu kecil tepi daun bisa bergigi jarang atau bergelombang. Tanaman ini tumbuh setinggi satu hingga lima kaki dan dibudidayakan secara luas di Asia, India, Cina, dan negara lain dengan iklim tropis. Tanaman marigold tumbuh di suhu antara 20°C dan 30°C serta musim dingin dan curah hujan tahunan yang cukup untuk berkembang (Singh dkk., 2020) tipe bongkol akarnya tunggal atau terkumpul, dengan susunan mahkota bunga rangkap yang berwarna putih, kuning, oranye, kuning keemasan atau berwarna ganda (Hanifah, 2022).

B. Skrining Fitokimia

1. Definisi skrining fitokimia

Fitokimia dalam arti luas adalah cabang ilmu yang mempelajari senyawa organik yang dibentuk dan dikumpulkan oleh tumbuhan, yang meliputi proses kimiawi, biosintesis, perubahan metabolisme, persebaran alami, dan aktivitas biologis. Dalam arti sempit, fitokimia sering digunakan untuk merujuk pada senyawa dalam sayuran dan buah-buahan yang tidak diperlukan untuk fungsi normal tubuh, tetapi memiliki efek menguntungkan bagi kesehatan manusia. Fitokimia bukanlah nutrisi, namun keberadaan fitokimia dalam tubuh akan membantu menjadikan tubuh lebih sehat, kuat dan sehat (Salmiyah S, 2018).

Analisis fitokimia merupakan langkah awal dalam analisis fitokimia yang berupaya memberikan wawasan tentang golongan senyawa yang terdapat pada tanaman yang diteliti. Uji fitokimia meliputi uji *alkaloid*, *flavonoid*, *saponin*, *tanin/polifenol*, *terpenoid*, dan *steroid*. Uji ini dilakukan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder (Yanti dan Vera, 2019).

Analisis fitokimia adalah cara untuk mengidentifikasi zat yang belum muncul melalui penelitian atau analisis yang dapat dengan mudah memisahkan zat alami yang mengandung fitokimia tertentu dan zat alami yang tidak mengandung fitokimia tertentu (Eko budi, 2015).

Analisis fitokimia adalah bagian dari ilmu farmakognosi yang mempelajari cara atau metode analisis senyawa kimia pada tumbuhan atau hewan secara keseluruhan atau bagian-bagiannya, termasuk cara mengklasifikasikan atau membaginya. Dalam beberapa tahun terakhir, fitokimia atau tanaman telah berkembang menjadi disiplin tersendiri, terletak di antara kimia organik dan biokimia tanaman, dan

terkait dengan keduanya. Bidang perhatiannya adalah berbagai senyawa organik yang dibentuk dan dikumpulkan oleh tanaman, yaitu komposisi, biosintesis, perubahan metabolisme, distribusi ilmiah, dan aktivitas biologis (Eko budi, 2015).

Salah satu cabang ilmu kimia yang mempelajari komposisi kimia tumbuhan adalah fitokimia. Melalui uji fitokimia, peneliti dapat mengidentifikasi berbagai jenis senyawa kimia yang terbentuk dan terkandung dalam tumbuhan, melalui komposisi kimia, biosintesis, perubahan metabolisme, dan bioaktivitas (Ikalinus dkk., 2015).

2. Metabolit sekunder

Secara umum, ada dua jenis metabolisme, yaitu metabolisme primer dan sekunder. Metabolisme primer menghasilkan metabolit primer sedangkan metabolisme sekunder menghasilkan metabolit sekunder. Metabolisme primer pada semua organisme memiliki proses dan jalur yang hampir sama sedangkan metabolisme sekunder memiliki jalur dan produk yang unik untuk setiap organ. Metabolisme primer terlibat dalam pertumbuhan, sedangkan metabolisme sekunder tidak terlibat dalam aktivitas pertumbuhan. Metabolit primer berperan dalam pengaturan fotosintesis dan respirasi, sedangkan metabolit sekunder berperan penting dalam fungsi pertahanan tumbuhan (Rachmawan dan Dalimunthe, 2017).

Metabolit sekunder diproduksi pada tingkat atau kondisi pertumbuhan tertentu. Kelompok senyawa ini diproduksi dalam jumlah banyak, tidak selalu dan hanya untuk keperluan tertentu. Kemampuan tumbuhan untuk melakukan fotosintesis membuat metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan sangat berbeda dengan metabolit sekunder yang dihasilkan organisme lain. Pada tumbuhan, metabolit

sekunder memiliki banyak fungsi, antara lain sebagai atraktan (penarik organisme lain), perlindungan terhadap patogen, perlindungan terhadap perubahan tekanan lingkungan, perlindungan terhadap radiasi ultraviolet, hingga penanggung jawab pertumbuhan dan bersaing dengan tumbuhan lain (alelopati) (Rachmawan dan Dalimunthe, 2017).

Metabolit sekunder adalah senyawa kimia yang seringkali aktif secara biologis dan bekerja untuk melindungi dari kondisi buruk seperti panas, iklim, masalah hama, penyakit tanaman dan dapat digunakan untuk mengobati berbagai penyakit pada manusia (Anita Chaudhari, Brinzel Rodrigues, 2016).

Metabolit sekunder adalah senyawa yang dihasilkan dari biogenesis metabolit primer. Umumnya dihasilkan oleh tumbuhan tingkat tinggi, yang bukan merupakan senyawa yang secara langsung menentukan kelangsungan hidup, melainkan karena sistem pertahanan diri tubuh. Kandungan metabolit sekunder terbukti aktif sebagai antikanker, antibakteri dan antioksidan yang meliputi *alkaloid*, *tanin*, *polifenol* dan turunannya (Eko budi, 2015).

Tanaman mampu mensintesis berbagai metabolit sekunder dengan struktur dan kerangka karbon yang kompleks dan unik. Metabolit sekunder tersebut merupakan salah satu sumber keanekaragaman struktur kimia dan aktivitas biologi. Sekitar 14 – 28% ekstrak tanaman tingkat tinggi digunakan sebagai obat-obatan, dan 74% diantaranya diketahui mempunyai fungsi medisinal setelah melalui proses etnomedik atau penggunaan sebagai obat tradisional (Rachmawan dan Dalimunthe, 2017).

Identifikasi metabolit sekunder yang dilakukan terhadap ekstrak batang Marigold (*Tagetes erecta* Linn.) hasil ekstraksi maserasi. Senyawa kimia yang diidentifikasi pada sampel tersebut meliputi:

a. *Alkaloid*

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa yang tersebar luas hampir pada semua spesies tumbuhan. Semua *alkaloid* mengandung setidaknya satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan membentuk cincin heterosiklik (Harborne, 1984). *Alkaloid* dapat ditemukan pada biji, daun, ranting dan kulit kayu dari tumbuh-tumbuhan. Kandungan *alkaloid* dari tumbuhan dapat mencapai 10-15%. *Alkaloid* kebanyakan bersifat racun, tetapi juga berguna dalam pengobatan (Eko budi, 2015).

b. *Flavonoid*

Flavonoid merupakan golongan senyawa polifenol yang diketahui mempunyai sifat sebagai penangkap radikal bebas, penghambat enzim hidrolisis dan oksidatif, dan bekerja sebagai antiinflamasi (Pourmourad dkk, 2006). Menurut Robinson (1995), *flavonoid* berfungsi mengatur pertumbuhan, fotosintesis, antimikroba dan antivirus. *Flavonoid* bermanfaat untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, antiinflamasi, mengatasi keropos tulang dan sebagai antibiotik (Ikalinus dkk., 2015).

c. *Tanin*

Tanin adalah himpunan polihidroksi fenol yang dapat dibedakan dari *fenol* lain karena kemampuannya mengendapkan protein, hal ini bisa dibuktikan apabila *tanin* direaksikan dengan gelatin akan terbentuk endapan, karena gelatin adalah salah satu jenis protein yang dapat diendapkan oleh *tanin*. Endapan tersebut

disebabkan karena adanya ikatan hidrogen antara *tanin* dan protein pada gelatin (Ikalinus dkk., 2015).

d. *Saponin*

Saponin adalah senyawa *glikosida steroid* atau *triterpen* ditemukan dalam berbagai tanaman (Purnamaningsih dkk., 2017). *Saponin* merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa yang stabil dalam air dan menghomolisis sel darah merah (Eko budi, 2015).

Saponin adalah senyawa dalam bentuk *glikosida* yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi dan beberapa hewan laut yang menghasilkan kelompok senyawa yang berbeda dari struktur, sifat fisikokimia dan efek biologisnya. Pada tumbuhan, *saponin* tersebar luas pada bagian-bagiannya seperti akar, batang, umbi, daun, biji dan buah (Purnamaningsih dkk., 2017).

e. *Steroid/triterpenoid*

Triterpenoid adalah kerangka karbon yang berasal dari enam satuan isoprene (2 – *metilbuta-1, 3-diene*) satuan C_5 dan diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yakni skualena. Senyawa golongan *triterpenoid* menunjukkan aktivitas farmakologi yang signifikan, seperti antiviral/antivirus, antibakteri, antiinflamasi yang sebagai inhibisi sintesis kolestrol dan sebagai antikanker (Nolla dkk., 2021).

Steroid adalah golongan *triterpenoid* dengan cincin perhidrofenantrena siklopentana, yang terdiri dari tiga cincin sikloheksana dan satu cincin siklopentana.

Steroid berperan penting dalam menjaga keseimbangan garam, mengatur metabolisme, dan meningkatkan fungsi organ pria dan wanita serta perbedaan aktivitas biologis lainnya antara pria dan wanita. *Steroid* pada tanaman telah terbukti menurunkan kolesterol dan mencegah kanker (Nola dkk., 2021).

C. Aktivitas Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai senyawa yang dapat menunda, memperlambat dan mencegah oksidasi lipid. Antioksidan adalah zat yang dapat mencegah terbentuknya reaksi radikal bebas (peroksida) dalam oksidasi lipid antioksidan dapat diperoleh dari makanan yang mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senawa fenolik. Antioksidan dari tumbuhan bekerja menghalangi kerusakan oksidatif dengan membentuk kelat dengan senyawa logam katalik dan menangkap oksigen (Yanuary, 2021).

Sumber antioksidan alami banyak terdapat dalam bahan pangan misalnya buah-buahan, rempah rempah, teh, coklat, dedaunan, biji-bijian, sayur-sayuran, enzim dan protein. Pada umumnya aktivitas antioksidan disebabkan karena tumbuhan tersebut mengandung senyawa metabolit sekunder /senyawa aktif, diantaranya adalah flavonoid, fenolik, tannin, antosianin (Rahmi H, 2017).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkap radikal bebas. Radikal bebas dihasilkan karena beberapa faktor, seperti asap, debu, polusi, kebiasaan mengkonsumsi makanan cepat saji yang tidak seimbang antara karbohidrat, protein dan lemaknya. Senyawa antioksidan akan mendonorkan satu elektronnya pada pada

radikal bebas yang tidak stabil sehingga radikal bebas ini bisa dinetralkan dan tidak lagi mengganggu metabolisme tubuh (Rahmi H, 2017).

Secara umum antioksidan dikelompokkan menjadi dua yaitu antioksidan enzimatis dan non-enzimatis.

- a. Antioksidan enzimatis misalnya enzim *superoksida dismutase* (SOD), katalase dan glutathion peroksidase.
- b. Antioksidan non-enzimatis masih terbagi dalam dua kelompok lagi yaitu antioksidan larut lemak, seperti *tokoferol*, *flavonoid*, *karotenoid*, *quinon* dan bilirubin. Dan Antioksidan larut air, seperti asam askorbat, asam urat, protein pengikat logam dan protein pengikat heme (Salmiyah S, 2018).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan dibagi dalam tiga kelompok yaitu antioksidan primer, sekunder dan tersier.

- a. Antioksidan primer (antioksidan endogenus)

Antioksidan primer meliputi enzim *superoksidase dismutase* (SOD), katalase dan *glutathion peroksidase* (GSH-Px). Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan primer, apabila dapat memberikan atom hydrogen secara cepat kepada senyawa radikal, kemudian radikal antioksidan yang terbentuk segera berubah menjadi senyawa yang lebih stabil. Belleville-Nabet (1996) menyebutkan bahwa antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, atau mengubah radikal bebas yang terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif. Sebagai antioksidan, enzim enzim tersebut menghambat pembentukan radikal bebas, dengan cara memutus reaksi berantai (polimerisasi), kemudian mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil

antioksidan dalam kelompok ini disebut juga dengan *chain breaking-antioxidant* (Salmiyah S, 2018).

b. Antioksidan sekunder (antioksidan eksogenus)

Antioksidan dalam kelompok ini juga disebut sistem pertahanan preventif. Dalam sistem pertahanan ini terbentuk senyawa oksigen reaktif dihambat dengan cara pengkelatan metal, atau dirusak pembentukannya. Antioksidan nonenzimatis dapat berupa komponen non nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Kerja sistem antioksidan non-enzimatik yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau menangkapnya. Akibatnya radikal bebas tidak dapat bereaksi dengan komponen seluler. Menurut suwoto (1999) dan lampe (2001), antioksidan sekunder meliputi vitamin C, vitamin E, Karotein, *Flavonoid*, asam urat, bilirubin dan albumin. Senyawa antioksidan non-enzimatis bekerja dengan cara menangkap radikal bebas (*free radical scavenger*), kemudian mencegah reaktivitas amplifikasinya, ketika jumlah radikal bebas berlebihan, kadar antioksidan non-enzimatik yang dapat diamati dalam cairan biologis menurun (Salmiyah S, 2018).

c. Antioksidan Tersier

Kelompok antioksidan tersier meliputi kelompok DNA repair dan metionin sulfoksida reductase. Enzim-enzim ini berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak akibat rektivitas radikal bebas. Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya single dan double strand, baik gugus non basa maupun basa. Perbaikan kerusakan basa dalam mtDNA dan DNA inti yang diinduksi senyawa oksigen reaktif terjadi melalui perbaikan jalur eksisi basa. Pada umumnya eksisi basa terjadi melalui

pemusnahan basa yang rusak yang dilakukan oleh DNA glikosilase. Sebagai contoh protein *Epg* (*MutM gene product*) *Echerechia colly* ternyata mengandung aktivitas DNA glikosilase dan lease pada sisi non basa (Salmiyah S, 2018).

D. Ekstrak dan Ekstraksi

1. Pengertian ekstrak

Menurut Depkes RI (2000), ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua/ hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Arsyad, 2017).

2. Faktor yang mempengaruhi mutu ekstrak

Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi mutu dari ekstrak yang telah dibuat, faktor utama yaitu faktor biologi dan faktor kimia.

a. Faktor biologis

Faktor biologis meliputi jenis tanaman, asal tanaman, waktu panen, penyimpanan bahan, umur dan bagian tanaman yang digunakan. Kondisi tanaman dipengaruhi oleh lingkungan seperti tanah, udara, iklim, suhu, cahaya, air, senyawa organik dan anorganik (Sawitti dkk., 2013).

b. Faktor kimia

Faktor kimia antara lain faktor eksternal dan faktor internal. Faktor eksternal yang mempengaruhi meliputi : ukuran bahan, penyaring yang digunakan dalam ekstraksi, kandungan logam berat dan pestisida pada tanaman dan metode ekstraksi yang digunakan. Faktor internal yang mempengaruhi mutu ekstrak

meliputi: jenis, komposisi kualitatif, komposisi kuantitatif, dan kadar rata-rata senyawa aktif yang terkandung (Sawitti dkk., 2013).

3. Pengertian ekstraksi

Ekstraksi adalah penyarian suatu senyawa kimia yang terkandung di dalamnya yang berasal dari tumbuhan maupun hewan. Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campuran dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ketika kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan penyaringan tanaman tercapai maka proses ekstraksi dihentikan. Setelah proses ekstraksi, selanjutnya pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan (Arsyad, 2017).

4. Macam macam ekstraksi

Berdasarkan ada tidaknya proses pemanasan, ekstraksi dapat dilakukan dengan dua cara yaitu:

- a. Ekstraksi dingin, tidak dilakukan pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung dengan tujuan agar senyawa yang diinginkan tidak menjadi rusak. Beberapa jenis metode ekstraksi cara dingin, yaitu maserasi dan peroklasi (Arsyad, 2017).
- b. Ekstraksi panas yaitu melibatkan panas dalam prosesnya, dengan adanya panas secara otomatis akan mempercepat proses penyaringan dibandingkan dengan cara dingin. Metodenya adalah *refluks*, ekstraksi dengan alat *soxhlet* dan influsa (Arsyad, 2017).

5. Metode ekstraksi

- a. Maserasi

Metode ini dilakukan dengan cara melarutkan serbuk tanaman atau serbuk sampel dengan menggunakan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert,

kemudian di tutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi selesai apabila tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Selanjutnya pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan (Arsyad, 2017).

b. *Ultrasound – assisted solvent extraction*

Metode maserasi dengan adanya modifikasi yaitu menggunakan bantuan ultrasound (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi serbuk tanaman atau serbuk sampel ditempatkan dalam wadah ultrasonic dan ultrasound (Arsyad, 2017).

c. Perkolasi

Dalam metode perkolasi, serbuk tanaman atau serbuk sampel dibasahi secara perlahan-lahan dalam perkolator (wadah berbentuk silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah (Arsyad, 2017).

d. *Soxhlet*

Pada metode *soxhlet* dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Dimasukan pelarut yang sesuai ke dalam labu, kemudian atur suhu penangas di bawah suhu *reflux* (Arsyad, 2017).

e. *Reflux* dan destilasi uap

Pada metode *reflux*, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik

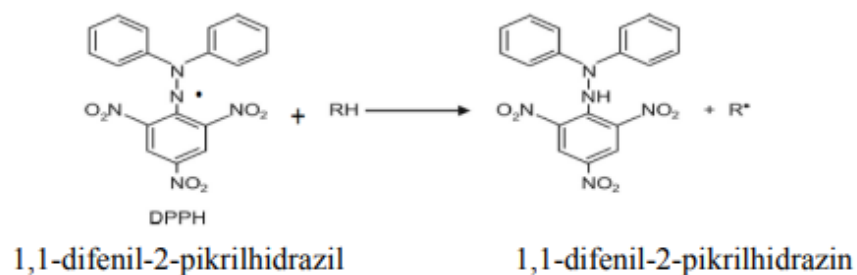
didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor (Arsyad, 2017).

E. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

DPPH merupakan suatu radikal bebas. Pengujiannya didasarkan pada pengukuran kapasitas peredaman oleh suatu antioksidan yang diukur pada panjang gelombang sekitar 515-517 nm. Aktivitas antioksidan dihitung dengan menentukan penurunan absorbansi produk pada konsentrasi yang berbeda dan dibandingkan dengan absorbansi blanko (tanpa bahan uji). Metode ini merupakan metode yang sederhana, akurat, valid, sensitif, dan relatif murah serta reproduksibel (Hikmawanti dkk., 2021). DPPH telah digunakan secara luas untuk mengukur kemampuan suatu senyawa untuk menghambat radikal bebas atau sebagai pendonor hidrogen, dan juga untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dalam makanan. Metode DPPH dapat digunakan pada sampel uji yang berupa cairan maupun padatan (Pine dkk., 2015).

Prinsip dari metode peredaman radikal bebas adalah mengukur daya hambat antioksidan terhadap radikal bebas seperti *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH), *superoxide anion* (O_2), *radikal hidroksi* (OH), atau *radikal peroksil* (ROO). Hasil yang bervariasi bisa didapat dari metode yang berbeda untuk mengukur aktivitas antioksidan berdasarkan radikal bebas yang digunakan dalam pengukuran (Rais LB, 2018).

Mekanisme reaksi dari pengujian aktivitas antioksidan adalah menggunakan radikal bebas yang direaksikan dengan sampel yang mengandung antioksidan maka akan terjadi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* yang berwarna ungu kemudian berubah menjadi *1,1-difenil-2-pikrilhidrazin* yang berwarna kuning (Rais LB, 2018). Reaksi yang terjadi dapat digambarkan sebagai berikut:



Sumber: (Rais LB, 2018)

Gambar 2: Reaksi Pengujian aktivitas antioksidan

Prinsip metode penangkapan radikal adalah pengukuran penangkapan radikal bebas sintetik dalam pelarut organik polar seperti etanol pada suhu kamar oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan. Proses penangkapan radikal ini melalui mekanisme pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas sehingga radikal bebas menangkap satu elektron dari antioksidan. Radikal bebas sintetik yang digunakan DPPH (Rais LB, 2018).

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah nilai IC₅₀ (*Inhibitor Concentration*). IC₅₀ merupakan parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH. Nilai IC₅₀ sendiri merupakan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat merendam radikal bebas sebanyak 50% atau IC₅₀ adalah bilangan

yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50% (Manongko dkk., 2020).

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh. Jika Nilai $IC_{50} < 50$ ppm menunjukkan kekuatan antioksidan sangat kuat, nilai IC_{50} 50-100 ppm menunjukkan kekuatan antioksidan kuat, nilai IC_{50} 100-250 ppm menunjukkan kekuatan antioksidan sedang, nilai IC_{50} 250-500 ppm menunjukkan kekuatan antioksidan lemah, dan nilai $IC_{50} > 500$ ppm menunjukkan kekuatan antioksidan tidak aktif (Lung dan Destiani, 2018).

75. *Antioxidant Activity Index (AAI)*

Metode penentuan kapasitas aktivitas antioksidan telah banyak dikembangkan, yaitu *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)*, *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)*, *Electron Spin Resonance (ESR)*, *2,2-azinobis 3 ethyl-benzothiazoline-6-sulphonate (ABTS)* dan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*, namun metode yang paling banyak digunakan dalam pengujian dan kemampuan aktivitas antioksidan suatu ekstrak atau senyawa adalah metode DPPH (Scherer dan Godoy 2009).

Hasil uji metode DPPH dapat ditampilkan dalam berbagai model, yaitu persentase hambatan, persentase DPPH tersisa, aktivitas antiradikal, dan aktivitas antioksidan setara dengan asam askorbat, namun di antara metode ini, penyajian hasil uji paling banyak berupa persentase hambatan 50%. Ketiadaan standarisasi hasil pengujian metode ini menyulitkan untuk membandingkan kemampuan dan kekuatan antioksidan dari ekstrak maupun senyawa murni. *Antioxidant Activity Index (AAI)* merupakan salah satu metode untuk menstandarisasi hasil pengujian antioksidan berdasar metode DPPH (Firdaus, 2013).

Cara lain untuk menyatakan aktivitas antioksidan ekstrak adalah dengan menggunakan *Antioxidant Activity Index* (AAI). Karena nilai IC₅₀ bergantung pada konsentrasi awal radikal bebas, AAI digunakan untuk mengklasifikasikan aktivitas antioksidan dari ekstrak. Menurut Scherer dan Godoy (2009) sifat antioksidan dibagi menjadi: lemah (AAI < 0,5 ppm), sedang (AAI <0,5 – 1,0 ppm), kuat (AAI <1,0 – 2,0 ppm) dan sangat kuat (AAI >2,0 ppm). Aktivitas antioksidan direpresentasikan juga sebagai *Antioxidant Activity Index*, dihitung dari hubungan berikut (Anghel dkk., 2021).

$$\text{Nilai AAI} = \frac{\text{Konsentrasi DPPH } (\mu\text{g/ml})}{\text{Nilai IC}_{50} (\mu\text{g/ml})}$$