

BAB II

TINJAUN PUSTAKA

A. Tanaman Kayu Putih (*Melaleuca cajuputi*)

Kayu putih, secara ilmiah dikenal sebagai *Melaleuca cajuputi*, merupakan jenis tumbuhan yang berpotensi tinggi dalam industry minyak astri. Tumbuhan ini memiliki peluang yang baik untuk dikembangkan (Dawan et al., 2023). Kayu putih adalah tanaman berhabitus pohon yang dapat mencapai tinggi sekitar 10 m. Tumbuhan ini termasuk dalam kategori penghasil minyak astri yang diperoleh dari daun dan ranting melalui proses penyulingan. Salah satu tanaman yang menghasilkan produk hutan bukan kayu dengan prospek pengembangan yang menjanjikan (Ariyanti, 2022).

Melaleuca cajuputi, yang sering di sebutan kayu putih, adalah tanaman penting dalam produksi minyak atsiri. Potensi kayu putih di Indonesia sangat besar, terutama di daerah-daerah seperti Maluku, Nusa Tenggara Timur, Sulawesi Tenggara, Bali, dan Papua. (Torry dan Dompeipen, 2019). Tanaman kayu putih diklasifikasikan sebagai berikut (Manek et al., 2023):



Sumber: (Dokumentasi Pribadi)
Gambar 1 Pohon Daun Kayu Putih

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermathophyte*

Subdivisi : *Angiospermae*
Kelas : *Dikotil*
Ordo : *Mirtales*
Famili : *Myrtaceae*
Genus : *Melaleuca*
Spesies : *Melaleuca cajuputi*

Tumbuhan kayu putih merupakan salah satu jenis tumbuhan yang mempunyai kebiasaan mirip pohon yang tingginya mencapai ± 10 m (Ariyanti, 2022). Batang *Melaleuca cajuputi* terdiri atas batang tunggal dengan struktur batang simpodial. Memiliki batang berwarna putih keabu-abuan, ukuran batang sedang. *Melaleuca cajuputi* mempunyai daun tunggal, kecil, agak tebal, bertangkai pendek, warnanya hijau, helaian daunnya lonjong, urat daunnya sejajar. Daun yang diremas atau diremukkan akan mengeluarkan aroma minyak kayu putih. Bunga *Melaleuca cajuputi* mempunyai bentuk bunga lonceng, mahkota berwarna putih dengan kepala putik berwarna putih kekuningan, Bunga *Melaleuca cajuputi* merupakan bunga majemuk (hermafrodit). Kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) mempunyai buah berbentuk kapsul dengan warna coklat. Buah ini mengandung biji berwarna coklat tua dan kotoran buah. Umumnya biji sempurna berwarna hitam kecokelatan, sedangkan biji tidak sempurna umumnya berbentuk agak pipih dan berwarna coklat muda (Manek et al., 2023).

Tanaman kayu putih banyak dimanfaatkan secara industri maupun domestik di Indonesia. Daun kayu putih yang dimasak dipercaya dapat digunakan untuk mengobati sakit perut, rematik, nyeri tulang dan saraf (neuralgia), radang usus,

diare, batuk, demam, sakit kepala, dan sakit gigi. Selain itu juga dapat digunakan sebagai obat oles untuk mengatasi peradangan kulit dan masalah kulit akibat alergi. Bila digunakan, kulit batang kayu putih bisa dicampur dengan bahan herbal lainnya. Misalnya untuk mengobati luka bernanah, Anda bisa mencampurkan kulit batang kayu putih dengan sedikit jahe dan asam jawa, lalu tumbuk hingga halus dan oleskan pada bagian luka. Campuran ini membersihkan luka dan menyerap nanah yang ada. (Suhartini et al., 2023).

Daun tanaman kayu putih secara empiris bermanfaat dalam mengatasi gejala penyakit seperti batuk, pilek, mual, dan muntah. Daun tersebut dapat digunakan dengan cara dihancurkan atau dibakar, lalu aromanya dihirup, dan air rebusannya diminum. Senyawa 1,8-Cineole yang terkandung di dalamnya memiliki manfaat klinis dalam pengobatan infeksi saluran pernapasan seperti influenza serta membantu meredakan sesak napas pada penderita asma bronkial. (Irfan et al., 2022). Daun kayu putih mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenol, tannin, terpenoid, termasuk aktivitas antioksidan, anti-inflamasi dan antimikroba. Flavonoid dan fenol dikenal karena perannya dalam mengurangi resiko penyakit kronis yang disebabkan oleh radikal bebas. Eugenol, sebagai komponen utama minyak atsiri kayu putih, juga menunjukkan sifat antiseptik dan analgesik, sering digunakan untuk meredakan gejala pernapasan dan infeksi ringan. Senyawa bioaktif ini menjadikan kayu putih berguna sebagai pengobatan tradisional dimasyarakat (Winska et al., 2019).

B. Radikal Bebas

Radikal bebas ialah sesuatu atom/molekul yang memiliki electron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan ini bisa menimbulkan sesuatu senyawa

ataupun molekul jadi lebih reaktif (Anggarani et al., 2023). Radikal bebas dapat disebut juga sebagai oksigen reaktif yang terus-menerus beredar di dalam tubuh dan muncul sebagai efek pengaruh dari berbagai jenis reaksi yang terjadi di dalam tubuh manusia. Umumnya dalam kondisi normal, radikal bebas dikeluarkan dari tubuh melalui proses antioksidan. Jika terjadi gangguan mekanisme alami ini maka radikal bebas akan terakumulasi secara berlebihan dan menyebabkan timbulnya beberapa penyakit (Chaudhary et al., 2023).

Radikal bebas dapat muncul dari proses metabolisme dalam tubuh yang merupakan faktor internal, namun juga dapat berasal dari berbagai faktor eksternal seperti polusi udara, radiasi sinar UV dan gaya hidup yang tidak sehat. Penyakit akibat radikal bebas cenderung menumpuk dan berkembang seiring berjalannya waktu. Berbagai penyakit yang umum dikaitkan dengan keberadaan radikal bebas antara lain kanker, katarak, serangan jantung, dan penurunan fungsi ginjal. Radikal bebas yang menguras electron dari sel-sel tubuh manusia bisa mengganggu struktur Deoxy Nucleic Acid (DNA) sehingga bisa merangsang terjadinya sel-sel mutase yang beresiko. Kehancuran sel akibat serangan radikal bebas bisa memunculkan bermacam permasalahan kesehatan yang serius serta kompleks seperti Kerusakan Deoxy Nucleic Acid (DNA), Kerusakan membran sel, Kerusakan protein, Kerusakan lipid peroksida, dan lain-lain (Fakriah et al., 2019).

C. Perbandingan Daun Muda dan Tua

Perbedaan daun muda dan daun tua setiap tanaman tidaklah selalu sama. Perbedaan ini tidak hanya mempengaruhi kandungan senyawa aktif, tetapi juga aktivitasnya. Selain itu, perbedaan tersebut dapat terlihat dari ukuran, warna, dan posisi daun (Mulangsri, 2018). Umumnya, daun muda memiliki warna hijau muda,

sebaliknya daun tua berwarna hijau tua. Ukuran daun muda biasanya lebih kecil jika dibandingkan dengan daun tua, dan posisi daun muda dapat ditemukan dari pucuk hingga urutan ketiga, sementara daun tua berada pada urutan kelima dan seterusnya dari pucuk (Leviana et al., 2023).

Perbedaan kandungan senyawa bioaktif antara daun muda dan tua dapat diamati melalui variasi jumlah dan konsentrasi senyawa kimia yang dihasilkan pada setiap tahap perkembangan daun. Secara umum daun muda memiliki kandungan senyawa bioaktif lebih tinggi dibandingkan daun tua. Perbedaan ini muncul karena daun yang lebih tua memiliki kemampuan lebih besar dalam mensintesis senyawa bioaktif. Proses pembentukan senyawa bioaktif sangat dipengaruhi oleh umur organ tanaman. Selain itu, peningkatan jumlah senyawa bioaktif juga dipengaruhi oleh rendahnya ketersediaan unsur hara dan intensitas cahaya yang diterima (Gultom et al., 2020).

Perbedaan kandungan metabolisme daun setiap tahap perkembangan, yang berkaitan dengan proses fotosintesis, juga dapat dipengaruhi oleh perbedaan kandungan komponen kimia. Klorofil, pigmen daun yang membantu fotosintesis dan menyerap sinar matahari, meningkatkan kemampuan daun untuk berfotosintesis yang berdampak pada metabolisme daun. Kadar klorofil ini dipengaruhi oleh usia daun.. Semakin tua daun semakin menurun kemampuannya dalam berfotosintesis secara bertahap. (Tinungki dkk., 2018).

Berdasarkan penelitian pada berbagai tanaman, aktivitas antioksidan menunjukkan variasi yang signifikan antara daun muda dan daun tua, di mana setiap fase perkembangan daun memiliki peran berbeda dalam menghasilkan dan

mengakumulasi senyawa antioksidan. Pada penelitian yang dilakukan (Leviana et al., 2023) aktivitas antioksidan daun muda dan tua tanaman durian (*Durio zibethinus*) menunjukkan perbedaan yang signifikan. Aktivitas antioksidan diukur dengan menggunakan nilai IC50, di mana nilai IC50, semakin rendah maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Hasil yang diperoleh pada penelitian menunjukkan bahwa daun tua dengan nilai IC50 sebesar 1,033 ppm memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan daun muda yang memiliki nilai IC50 sebesar 4,066 ppm. Perbedaan ini disebabkan oleh semakin tingginya kandungan total fenolik dan total flavonoid pada daun tua.

Penelitian dilakukan oleh (Maleke dkk., 2024) terhadap aktivitas antioksidan antara daun muda dan tua pada tanaman soyogik (*Saurauia bracteosa*) menunjukkan bahwa daun muda memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi. Sampel daun soyogik mengandung senyawa antioksidan seperti tanin, terpenoid, flavonoid, dan saponin. Ekstrak daun muda memiliki kemampuan menangkal radikal bebas hingga 70,63%, sedangkan daun tua hanya mencapai 70,204%, menurut uji antioksidan DPPH . Rendahnya aktivitas penangkal radikal bebas pada daun tua dibandingkan daun muda kemungkinan disebabkan oleh terhentinya biosintesis metabolit sekunder baru pada proses pematangan daun.

D. Ekstrak dan Ekstraksi

Sediaan pekat yang dihasilkan dengan mengekstrak bahan aktif dari bahan tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang tepat disebut ekstrak. Setelah proses ekstraksi selesai, pelarut dihilangkan dan sisa massa atau bubuk diproses lebih lanjut hingga memenuhi standar yang ditentukan (Octavia et al., 2023). Ada berbagai jenis ekstrak termasuk ekstrak cair, ekstrak kental dan ekstrak kering.

Ekstrak cair biasanya memiliki kandungan air lebih dari 30%, sedangkan ekstrak kental memiliki kandungan air sekitar 5-30%. Sedangkan ekstrak kering memiliki kandungan air yang lebih rendah, sekitar 5% (Syamsul et al., 2020). Dua faktor utama yang mempengaruhi mutu ekstrak adalah sifat biologis bahan tanaman obat dan komposisi kimia bahan obat.(Prastiwi et al., 2017):

a. Faktor biologi

Kualitas suatu ekstrak dipengaruhi oleh sumber bahan, yaitu tumbuhan. Faktor-faktor biologis mencakup identitas jenis, lokasi pertumbuhan, waktu panen, cara penyimpanan bahan tumbuhan, usia tanaman, dan bagian tanaman yang digunakan (Prastiwi dkk., 2017).

Terdapat dua kelompok besar pada faktor kimia, yaitu faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal meliputi berbagai aspek seperti jenis bahan aktif yang terkandung dalam bahan, komposisi kualitatif dan kuantitatif senyawa tersebut, serta rata-rata jumlah total bahan aktif yang ada. Di sisi lain, faktor eksternal berhubungan dengan teknik ekstraksi yang digunakan, termasuk perbandingan ukuran alat ekstraksi, tingkat kelembapan bahan, serta jenis pelarut yang diterapkan dalam proses tersebut (Prastiwi et al., 2017).

Ekstraksi adalah proses pemisahan yang didasarkan pada perbedaan kemampuan komponen untuk larut menggunakan pelarut tertentu (Handoyo, 2020). Secara umum, proses ekstraksi dapat dibagi menjadi dua ekstraksi padat-cair (leaching) dan ekstraksi cair-cair. Metode pemisahan zat terlarut dari padatan yang tidak larut, sering disebut inert, dan dilakukan dalam beberapa tahap tertentu disebut ekstraksi padat-cair (leaching). Pektin dapat dilarutkan dalam berbagai pelarut, termasuk air, senyawa organik, basa dan asam. Proses ekstraksi pektin

melibatkan hidrolisis protpektin, yang memecahnya menjadi pektinat (pektin) saat dipanaskan dalam lingkungan asam selama jangka waktu tertentu dan pada suhu tertentu. (Aji et al., 2017). Terdapat beragam metode ekstraksi yang dapat digunakan, yaitu:

a. Maserasi

Metode ekstraksi yang umumnya digunakan untuk mengisolasi senyawa dari bahan alami dengan menerapkan pelarut organik pada suhu yang telah ditentukan yaitu maserasi. Proses ini murah dan mudah dilakukan dan memiliki keuntungan dalam memisahkan senyawa dari bahan alami. Selama proses perendaman, dinding sel akan pecah sehingga metabolit sekunder yang terdapat pada sitoplasma akan larut hal ini terjadi karena tekanan yang ada di dalam dan di luar sel. Prosedur maserasi faktor suhu, durasi waktu, dan tipe pelarut yang dipilih. Pemilihan suhu optimal akan mempengaruhi hasil ekstraksi tanin, berdasarkan suhu yang terlalu tinggi dan waktu ekstraksi yang terlampau lama akan mengurangi rendemen tanin. Tipe pelarut yang digunakan pun memiliki peran dalam peningkatan kandungan total tanin yang dapat diekstrak (Fakhruzy et al., 2020).

b. Infundasi

Metode ini umum digunakan untuk mengekstraksi bahan aktif yang larut dalam air dari tanaman dengan merendam simplisia dalam air pada suhu 90°C selama 15 menit. Hasil dari proses ini disebut infus. Teknik ini sederhana dan sering diterapkan oleh perusahaan obat tradisional. Dengan beberapa modifikasi, metode ini juga sering digunakan untuk menghasilkan ekstrak (Sariyem et al., 2015).

c. Perkolasi

Metode perkolasi adalah cara untuk mengekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut yang baru yang terus-menerus mengalir melalui simplisia hingga senyawa yang terkandung di dalamnya terlarut sepenuhnya (Deanggi et al., 2023).

d. Soxhletasi

Metode soxhletasi adalah cara ekstraksi dengan alat yang disebut soxhlet, di mana sampel dan pelarut ditempatkan dalam dua wadah yang berbeda. Prinsip dasar dari metode ini adalah melakukan ekstraksi secara berkesinambungan dengan menggunakan jumlah pelarut yang relatif kecil. Ekstrak yang diinginkan dapat diperoleh dengan menguapkan pelarut setelah prosedur ekstraksi selesai. Umumnya, pelarut yang digunakan yaitu pelarut yang memiliki sifat volatil atau titik didih yang rendah. Proses soxhletasi dilakukan dengan cara memanaskan pelarut, sehingga terjadi sirkulasi yang efisien dalam proses ekstraksi (Firyanto et al., 2020).

e. Reflux

Refluks adalah metode ekstraksi yang menggunakan pemanas untuk mengekstrak andrografolid, yang merupakan senyawa tahan panas. Dalam kondisi ini, pemanasan biasa akan menyebabkan pelarut menguap sebelum reaksi penuh. Prinsip dari metode refluks adalah menjaga agar pelarut volatil tetap tersedia selama proses reaksi. Pada suhu tinggi, pelarut memang akan menguap, tetapi uap tersebut kemudian didinginkan oleh kondensor, sehingga mengembung dan Kembali ke wadah reaksi. Dengan cara ini, pelarut tetap tersedia selama proses reaksi berlangsung (Azhari et al., 2020).

E. Rendemen ekstrak

Rendemen merujuk pada perbandingan antara jumlah ekstrak yang berhasil diperoleh dan jumlah simplisia yang digunakan dalam proses ekstraksi, dan biasanya dinyatakan dalam bentuk persentase (%). Semakin banyak ekstrak yang dihasilkan dari bahan yang digunakan maka semakin tinggi nilai rendemennya (Bani et al., 2023). Nilai rendemen berkaitan erat dengan jumlah senyawa bioaktif yang terdapat dalam tumbuhan. Nilai rendemen dikatakan baik jika nilainya tidak kurang dari 10% (Saerang et al., 2023). Artinya, semakin besar jumlah ekstrak yang diperoleh berbanding lurus dengan jumlah kandungan bioaktif yang terkandung dalam tumbuhan tersebut. Dalam menghitung rendemen ekstrak kental yang diperoleh menggunakan rumus (Senduk et al., 2020):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak kental}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

F. Skrining Fitokimia

Dalam mengidentifikasi senyawa aktif pada suatu tanaman dapat dilakukan Skrining fitokimia. Kandungan kimia tanaman dipengaruhi oleh banyak faktor, seperti lokasi, suhu, iklim, dan kesuburan tanah. Sampel dapat diambil dari bagian tumbuhan yang biasa digunakan sebagai obat dalam pengobatan modern dan tradisional. (Muthmainnah, 2019). Skrining fitokimia berfokus pada identifikasi senyawa metabolit sekunder dalam tanaman secara kualitatif. Senyawa-senyawa bioaktif yang sering ditemukan melalui analisis ini meliputi alkaloid, antrakuinon, flavonoid, kumarin, saponin, tanin, polifenol, dan minyak atsiri. Perubahan warna yang terjadi ketika ditambahkan dengan larutan pereaksi merupakan metode yang digunakan pada uji skrining fitokimia (Kusumo et al., 2022).

Peran metabolit sekunder memainkan peran penting bagi tubuh dalam jangka panjang, sering kali berfungsi sebagai bagian dari mekanisme pertahanan dan metabolit sekunder memberikan karakteristik khusus dalam bentuk senyawa warna. Selain itu, mereka memiliki peran penting dalam jalur metabolisme primer. Metabolit sekunder sering dipakai guna mengatur aktivitas metabolisme sel dan pertumbuhan tanaman. Metabolit sekunder membantu tanaman mempertahankan keseimbangan yang kompleks dengan lingkungan dan beradaptasi sesuai dengan kebutuhan lingkungan tersebut (Julianto, 2019). Beberapa penggunaan metabolit sekunder meliputi bahan obat, bahan kimia pertanian, suplemen makanan, dan bahan kosmetik. Contoh metabolit sekunder yang telah dipasarkan dan dikenal luas adalah penisilin dan morfin (Dalimunthe dan Rachmawan, 2017). Dalam mengidentifikasi metabolit sekunder dilakukan terhadap ekstrak daun kayu putih muda dan tua dengan hasil ekstraksi remaserasi. Senyawa kimia yang diidentifikasi pada sampel tersebut yaitu:

a. Flavonoid

Salah satu jenis metabolit sekunder tumbuhan adalah flavonoid. Senyawa ini terdapat pada buah-buahan dan sayuran, serta berbagai jenis minuman, dan struktur yang termasuk polifenol. Flavonoid menawarkan sejumlah manfaat Efek biokimia dan antioksidan yang terkait dengan sejumlah penyakit, termasuk aterosklerosis, kanker, dan alzheimer. Flavonoid juga berkontribusi pada kesehatan secara umum dan merupakan komponen penting dalam berbagai obat, obat-obatan, kosmetik, dan produk nutraceutical.. (Khoirunnisa dan Sumiwi, 2019). Selain itu flavonoid juga berpotensi sebagai antibakteri (Putri dkk., 2023)

b. Fenol

Fenol merupakan senyawa utama dalam kelompok fenolik yang banyak ditemukan pada berbagai jenis tumbuhan. Senyawa ini memiliki satu gugus hidroksil yang terintegrasi dalam strukturnya. Fenol berasal dari jalur pentosa fosfat, shikimate, dan fenilpropanoid yang ada dalam tanaman yang termasuk dalam kategori metabolit sekunder. Hubungan antara fenol dan aktivitas antioksidan sangat erat, karena fenol memiliki peran krusial dalam menjalankan fungsi sebagai agen antioksidan (Badriyah et al., 2017).

c. Tanin

Tanin adalah senyawa dengan jumlah gugus hidroksi fenolik yang banyak ditemukan pada tumbuh-tumbuhan. Salah satu senyawa aktif metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antioksidan, antibakteri, anti diare, astringen (Habibah dan Ratih, 2023).

d. Saponin

"*Saponin*" diambil pada nama tanaman *Saponaria vaccaria*, yang memiliki kandungan saponin dan sering digunakan untuk bahan pembersih. Saponin merupakan glikosida kompleks dengan berat molekul yang tinggi dibuat dengan banyak organisme, seperti tumbuhan, hewan laut, dan beberapa spesies bakteri. (Putri dkk., 2023).

e. Alkaloid

Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder basa yang dijumpai dalam berbagai komponen tanaman, termasuk kulit batang, ranting, akar, daun, bunga, dan biji. Biasanya, alkaloid diproduksi dalam sistem siklik. (Maisarah et al., 2023)

f. Steroid

Steroid memiliki ciri-ciri sistem empat cincin yang tergabung, dimana senyawa metabolit sekunder ini memiliki kerangka dasar triterpena asiklik, Senyawa ini merupakan komponen aktif dari tumbuhan yang telah digunakan untuk mengobati beberapa penyakit (Ludin dan Sakung, 2022).

g. Terpenoid

Senyawa metabolit sekunder yang memiliki peran penting sebagai senyawa kimia aktif yaitu terpenoid, yang dapat memberikan efek fisiologis serta farmakologis yang signifikan. Tumbuhan dengan khasiat pengobatan sering mengandung terpenoid, yang merupakan komponen dari minyak atsiri dan resin. Terpenoid memiliki berbagai aktivitas biologis, termasuk sebagai antibakteri, penghambat sel kanker, penghambat sintesis kolesterol, antiinflamasi, serta dalam pengobatan permasalahan pada menstruasi, gigitan ular, masalah kulit, kerusakan hati, dan malaria. (Mierza et al., 2023).

G. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang mampu menyerap atau menetralkan radikal bebas, sehingga berperan dalam pencegahan berbagai penyakit degeneratif, seperti penyakit kardiovaskuler, kanker dan lainnya. Terdapat dua sumber utama antioksidan yaitu enzimatis dan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis dapat berupa molekul kompleks, seperti superoksida dismutase, katalase, dan peroksidase, atau berupa senyawa sederhana, seperti glutathione dan vitamin (A, C, E, serta β -karoten). Senyawa ini penting bagi tubuh dengan fungsinya sebagai menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel, protein, serta lemak. Struktur molekul antioksidan memungkinkan pemberian elektron pada radikal

bebas tanpa mengganggu fungsinya, sekaligus memutuskan rantai reaksi radikal bebas. Saat ini, antioksidan alami banyak ditemui dalam tanaman hijau (Pratiwi dkk., 2023).

Selain antioksidan enzimatik, terdapat pula antioksidan non-enzimatik, yang bisa berupa senyawa nutrisi maupun non-nutrisi. Antioksidan non-enzimatik banyak ditemukan dalam sayuran, buah-buahan, biji-bijian, dan kacang-kacangan. Beberapa senyawa kimia yang termasuk antioksidan alami berasal dari berbagai golongan senyawa dalam tanaman (Pratiwi dkk., 2023). Tubuh manusia tidak mampu memproduksi (antioksidan alami) mikronutrien dan senyawa metabolit sekunder ini secara mandiri, sehingga zat-zat tersebut perlu ditambahkan melalui makanan (rempah-rempah, buah-buahan dan sayuran). Antioksidan yang berasal dari tumbuhan merupakan kelompok besar senyawa bioaktif yang terdiri dari flavonoid, senyawa fenolik, senyawa yang mengandung belerang, tanin, alkaloid, diterpene fenolik, dan vitamin. Oleh karena itu diperlukan asupan antioksidan dari luar tubuh untuk mendukung sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas (Ibroham dkk., 2022).

Metode *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* (DPPH), merupakan metode yang umum dipakai, dapat digunakan untuk mengukur kapasitas senyawa untuk menetralkan radikal bebas dalam sampel. DPPH adalah radikal bebas yang stabil. Metode ini menggunakan radikal stabil untuk memberikan informasi tentang reaktivitas senyawa yang diuji. Karena kecepatan, kemudahan, keakuratan, dan jumlah sampel yang minimal, uji DPPH adalah metode *in vitro* yang populer (Lung dan Destiani, 2017). Prinsip utama metode DPPH adalah antioksidan akan mengambil atom

hydrogen yang di donorkan oleh DPPH. Akibatnya, DPPH diubah menjadi bentuk tereduksi yang tidak bersifat radikal.(Puspitasari dan Ningsih, 2016).

Metode uji aktivitas antioksidan DPPH berdasarkan pada reaksi reduksi yang melibatkan radikal bebas DPPH yang terlarut pada pelarut. Larutan DPPH memiliki warna ungu yang khas. Ketika larutan DPPH berinteraksi dengan senyawa donor elektron (antioksidan), radikal bebas DPPH akan mengalami reduksi, yang mengakibatkan warna ungu larutan memudar dan beralih menjadi kuning. Perubahan warna ini disebabkan oleh gugus pikril yang terdapat dalam struktur DPPH. Proses reduksi ini menunjukkan bahwa antioksidan dalam sampel uji telah berhasil menetralkan radikal bebas. Semakin besar tingkat reduksi DPPH, semakin kuat kemampuan zat tersebut dalam mengatasi radikal bebas (Wulan et al., 2019).

Dalam metode DPPH, IC₅₀ digunakan sebagai parameter dalam mengukur konsentrasi senyawa antioksidan yang dapat menghambat 50% dari proses oksidasi (Lung dan Destiani, 2017). Semakin rendah nilai IC₅₀, semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Selanjutnya, dibuat kurva yang menggambarkan hubungan antara konsentrasi dan persentase inhibisi untuk menentukan nilai Inhibitory Concentration 50% (IC₅₀)

Tabel 1
Kategori *Inhibition Concentration* 50 (IC₅₀)

Nilai IC ₅₀	Kategori
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
101-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat Lemah

Sumber: (Fatmawati dkk., 2023).

Berdasarkan metode DPPH, *Antioxidant Activity Index* (AAI) adalah cara untuk menstandarkan temuan pengujian aktivitas antioksidan. Sifat antioksidan dikategorikan menggunakan nilai AAI. (Sawiji dan Jawa, 2021).

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

Aktivitas antioksidan dalam suatu ekstrak atau senyawa berdasarkan AAI dibagi menjadi 4, yaitu :

Tabel 2

Kategori Nilai *Antioxidant Activity Index* (AAI)

Nilai AAI (ppm)	Kategori
<0,5	Lemah
0,5-1,0	Sedang
>1,0-2,0	Kuat
>2,0	Sangat Kuat

Sumber: (Segara dan Kurniawan, 2023)