

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)



Gambar 1 Daun Salam (*Syzygium polyanthum*)

Sumber: Dokumentasi Pribadi

1. Deskripsi dan klasifikasi tanaman salam

Daun salam (*Syzygium polyanthum*) merupakan satu diantara jenis tumbuhan yang sering dimanfaatkan masyarakat untuk bahan makanan serta sebagai obat tradisional (Harismah dan Chusniatun, 2022). Daun ini juga sering dimanfaatkan dalam masakan Asia seperti di Malaysia, Thailand, dan Vietnam. Daun salam dapat menghasilkan aroma yang lebih harum serta rasa yang khas pada makanan, meskipun daun segar umumnya lebih wangi dibanding daun kering akibat berkurangnya kandungan minyak atsiri (Tanjung, 2024). Nama ilmiah dari daun salam yaitu *Syzygium polyanthum*, namun dalam bahasa Inggris dikenal sebagai *Indonesian bay-leaf* atau *Indonesian laurel*. Ciri-ciri pohon salam adalah kulit yang terkelupas, pecah, dan batang bawah yang berbatu. Kulit pohon salam yang bernuansa abu-abu gelap menjadi lebih cerah dan halus seiring meningkatnya

ketinggian pohon. Serta kayu dari pohon salam tahan terhadap air (Wahyudi *dkk.*, 2024). Tanaman salam pada dasarnya tumbuh pada daerah dengan ketinggian antara 5 hingga 1000 meter di atas permukaan laut. Bunga salam bersifat hermafrodit, memiliki kelopak dan mahkota, dengan jumlah benang sari yang berlimpah, serta terkadang kelopak berhadapan dengan daun mahkotanya (Tanjung, 2024).

Berdasarkan jurnal Tanjung (2024), klasifikasi taksonomi tanaman daun salam yaitu:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Kelas : *Dicotyledoneae*

Ordo : *Myrtales*

Famili : *Myrtaceae*

Genus : *Syzygium*

Spesies : *Syzygium polyanthum*

2. Morfologi daun salam

Daun salam mempunyai warna hijau, aroma lemah yang aromatik, serta rasa pahit. Daun salam mempunyai tepi yang rata, permukaan atas berwarna hijau kecoklatan, licin, mengkilap, tulang daun menyirip, dan menonjol di permukaan bawah serta memiliki tulang cabang halus. Daunnya memiliki bentuk lonjong hingga elips atau bundar telur terbalik, dengan pangkal meruncing dan ujung yang tumpul. Ukuran daun salam bervariasi, panjangnya sekitar 50–150 mm dan lebarnya 35–65 mm, serta memiliki 6–10 urat daun lateral. Sementara itu, panjang tangkai daunnya berkisar antara 5–12 mm (Tanjung, 2024).

3. Kandungan senyawa bioaktif daun salam

Pada penelitian Faustina dkk. (2023) menunjukkan hasil fitokimia ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum*) menunjukkan hasil positif pada beberapa senyawa bioaktif diantaranya alkaloid, flavonoid, saponin, betasianin, tanin, steroid, terpenoid, fenol, kardio glikosida, dan kuinon. Daun salam biasanya dimanfaatkan pengobatan kolesterol, mengurangi gejala maag, memperbaiki sistem pencernaan, menurunkan tekanan darah, berpotensi mengurangi risiko stroke, asam urat, dan memperlancar peredaran darah serta menurunkan kadar gula darah melalui mekanisme penghambatan penyerapan glukosa di usus serta mengoptimalkan pemanfaatannya oleh otot (Hakim, 2015).

B. Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik memisahkan senyawa aktif dari simplisia dengan pelarut tertentu. Simplisia merupakan bahan baku alami yang berasal dari tumbuhan, hewan, atau mineral yang telah mengalami proses pengeringan sebelum dilakukan proses ekstraksi untuk memperoleh zat aktifnya. Proses pengeringan bertujuan untuk meningkatkan daya simpan bahan dan memudahkan proses penggunaannya. Simplisia biasanya dimanfaatkan untuk bahan pokok dalam proses ekstraksi. Secara garis besar, teknik ekstraksi dapat dibedakan berdasarkan temperatur yang diterapkan, yaitu teknik dingin dan teknik panas. Metode dingin seperti metode maserasi dan perkolasi, adapun metode panas mencakup refluks, soxhletasi, infusi, dekokta, distilasi, dan digesti. Selain kedua metode tersebut, ada juga teknik ekstraksi modern seperti ekstraksi dengan sentrifugasi, superkritikal, atau ultrasonik (sonikasi) (Triyanti dkk., 2025). Menurut Fitriana (2023) ekstrak dapat dibagi menjadi 4 bagian yaitu:

1. Ekstrak cair merupakan sediaan cair dari simplisia tanaman yang menggunakan etanol untuk pelarut atau sebagai pelindung.
2. Ekstrak encer merupakan sediaan yang memiliki konsistensi cair hingga kental menyerupai madu dan masih dapat dituangkan.
3. Ekstrak kental merupakan sediaan yang dapat diamati dalam keadaan dingin dan tidak dapat dituang, kadar air dalam ekstrak ini mencapai hingga 30%.
4. Ekstrak kering merupakan sediaan ekstrak yang dihasilkan melalui proses pengeringan ekstrak pekat di dalam oven dengan suhu rendah.

Menurut (Sitompul dan Sutriningsih, 2017) tujuan ekstraksi dapat beragam. Pertama, untuk mendapatkan senyawa bioaktif yang sebelumnya tidak teridentifikasi. Kedua, mengambil senyawa-senyawa tertentu yang sudah teridentifikasi keberadaannya di dalam suatu organisme. Ketiga, memperoleh kelompok senyawa yang mempunyai hubungan struktural dalam suatu organisme. Selain itu, ekstraksi juga bertujuan memperoleh semua metabolit sekunder yang diperoleh dari suatu sumber, termasuk senyawa yang mungkin tidak muncul pada sumber lain karena perbedaan spesies atau perbedaan lingkungan tempat tumbuhnya.

Menurut Marjoni (2024) proses ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya:

1. Jumlah bahan simplisia yang akan diekstrak

Jumlah simplisia yang akan diekstrak berpengaruh besar terhadap jumlah pelarut yang dibutuhkan, semakin banyak simplisia yang dipakai, semakin banyak pelarut yang dibutuhkan dalam merendam bahan secara keseluruhan.

Ketidakseimbangan antara jumlah simplisia dan pelarut dapat menyebabkan ekstraksi senyawa yang tidak optimal karena pelarut mencapai titik kejenuhan.

2. Derajat kehalusan simplisia

Semakin halus suatu simplisia, semakin besar permukaan kontak dengan pelarut, yang mengoptimalkan efektivitas proses ekstraksi. Simplisia yang dihancurkan hingga berukuran kecil mempunyai luas permukaan kontak yang lebih luas sehingga pelarut dapat masuk ke dalam jaringan dengan lebih mudah dan mempercepat proses pelarutan komponen bioaktif (Hujjatusnaini *dkk.*, 2021). Namun, penghalusan yang terlalu berlebihan juga harus dihindari karena dapat menyebabkan bubuk terlalu halus dan menyulitkan proses penyaringan.

3. Jenis pelarut yang digunakan dalam ekstraksi

Penggunaan pelarut dalam proses ekstraksi didasarkan pada karakteristik kelarutannya. Variasi jenis pelarut yang digunakan dapat memengaruhi jumlah senyawa aktif yang berhasil diperoleh dari bahan alami. Dengan demikian, pemilihan pelarut yang sesuai menjadi kunci utama untuk meningkatkan efektivitas dan mendapatkan hasil terbaik dalam proses ekstraksi sampel. Menurut Dwi *dkk.*, (2022) efektivitas ekstraksi yang dapat menyebabkan perubahan pada senyawa seperti prinsipnya yaitu *like dissolve like* yang artinya senyawa akan terlarut pada pelarut yang memiliki sifat kelarutan yang sama. Senyawa polar umumnya cenderung larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa nonpolar lebih cenderung larut pada pelarut nonpolar. Pemilihan jenis pelarut perlu memperhatikan beberapa aspek penting, antara lain tingkat selektivitas, ketersediaan, stabilitas, kemudahan dalam penguapan, serta efisiensi biaya. Ada beberapa kriteria supaya pelarut dapat dipakai pada proses ekstraksi, yaitu harus menjadi pelarut terbaik untuk tanaman

yang ingin diekstraksi dan bahan pelarut harus bisa dipisahkan dengan segera setelah pencampuran (Hujjatusnaini *dkk.*, 2021). Penelitian Hujjatusnaini *dkk.* (2021) menyatakan bahwa terdapat berbagai jenis pelarut yang sering dimanfaatkan pada proses ekstraksi antaranya yaitu:

a. Metanol

Metanol (CH_3OH) merupakan senyawa yang mempunyai sifat ganda, yaitu polar karena adanya gugus $-\text{OH}$ dan non-polar karena gugus $-\text{CH}_3$. Meskipun demikian, metanol adalah senyawa yang memiliki sifat polar.

b. N-Heksana

Pelarut n-heksana adalah non-polar, sehingga dapat melarutkan komponen non-polar lainnya, termasuk beberapa gugus pada senyawa warna seperti flavonoid dan tanin. Secara umum, heksana merupakan cairan jernih yang tidak bisa dicampurkan dengan air.

c. Etil asetat

Etil asetat merupakan pelarut semi polar yang tidak dapat menarik senyawa yang sangat polar atau non-polar, tetapi pelarut ini bagus digunakan dalam ekstraksi karena mudah untuk diuapkan, tidak mudah menyerap air, dan memiliki tingkat toksisitas yang rendah.

d. Etanol 70%

Etanol 70% adalah pelarut polar yang terdiri dari gabungan etanol dan air dengan rasio 70:30. Pada ekstraksi, etanol 70% sering dipakai karena penambahan air meningkatkan polaritas pelarut, sehingga lebih efektif dalam menarik senyawa polar seperti flavonoid, fenolik, tanin, dan metabolit polar lainnya. Kombinasi etanol dan air ini juga mengoptimalkan proses penarikan senyawa dibandingkan

dengan etanol murni, karena air membantu merusak dinding sel bahan sehingga komponen aktif lebih mudah diekstrak (Nurcahyani, Raharjo dan Apriliawan, 2025).

e. Akuades

Akuades adalah air sulingan murni yang bebas dari kandungan logam dan anion, dan memiliki pH netral sekitar 7. Akuades bersifat murni, bening, tidak berbau, dan tidak rasa. Sebagai pelarut, akuades efisien dalam melarutkan berbagai senyawa organik netral yang mempunyai gugus fungsional polar, seperti gula, alkohol, aldehida, serta keton. Akuades akan membentuk ikatan hidrogen dengan gugus hidroksil pada gula dan alkohol, serta dengan gugus karbonil pada aldehida dan keton (Tominik dan Haiti, 2020).

4. Waktu ekstraksi

Durasi yang terlalu panjang atau terlalu pendek dapat mengubah sifat fisik dan kimia dari bahan yang diekstraksi. Waktu ekstraksi yang terlalu singkat dapat mengakibatkan pelarutan senyawa fenolik yang tidak maksimal, sehingga bahan belum tereksplorasi sepenuhnya. Sedangkan, jika durasi ekstraksi yang lebih panjang dapat menambah jumlah analit yang diekstraksi karena pertemuan antara pelarut dan zat terlarut berlangsung lebih lama, sehingga mengakibatkan proses pelarutan senyawa fenolik berlanjut dan selesai hingga pelarut mencapai titik jenuh. Penambahan waktu ekstraksi tidak akan memperbesar kandungan senyawa fenolik yang diekstraksi (Kristanti, Widarta dan Permana, 2019).

5. Metode ekstraksi

Beberapa macam metode ekstraksi yaitu meserasi, remaserasi, perkolasi, sokletasi, refluks dan destilasi uap. Pemilihan metode yang tepat harus

memperhatikan sifat fitokimia dari senyawa target, jenis pelarut yang dipakai serta ketersediaan alat. Metode maserasi adalah metode yang akan digunakan pada penelitian ini. Maserasi merupakan metode sederhana dengan merendam serbuk simplisia ke dalam pelarut. Prinsipnya didasarkan pada kemampuan pelarut dalam menembus dinding sel dan mengekstrak komponen aktif di dalam sel. Metode maserasi dapat mencegah kerusakan berbagai senyawa yang sensitif terhadap panas (termolabil) (Hujjatusnaini *dkk.*, 2021).

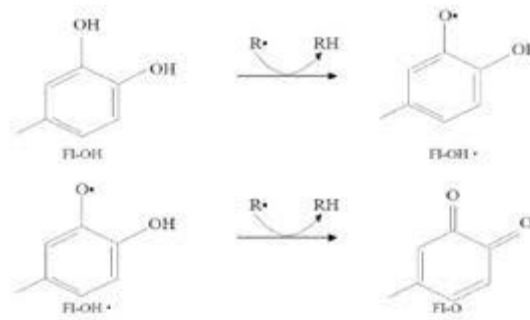
6. Kondisi proses ekstraksi

Dalam maserasi, proses ekstraksi dipengaruhi oleh suhu, rasio pelarut–bahan, pengadukan, ukuran wadah, dan kondisi lingkungan. Walaupun pada dasarnya dilakukan pada suhu ruang, adanya kenaikan suhu walaupun sedikit dapat mempercepat kelarutan dan difusi senyawa aktif selama tidak merusak komponennya (Susanti dan Malis, 2025). Rasio pelarut dan simplisia yang tepat memastikan pelarut cukup dan gradien konsentrasi tetap optimal. Proses pengadukan membantu penyebaran pelarut dan mencegah penumpukan pelarut jenuh di sekitar simplisia. Ukuran wadah dan kondisi lingkungan yang stabil, terutama wadah tertutup rapat, penting untuk mencegah penguapan dan kontaminasi selama ekstraksi (Hakim *dkk.*, 2024).

C. Senyawa Flavonoid Total

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang sering diperoleh dari tanaman karena kemampuannya sebagai antikanker, antimikroba, dan antioksidan. Sebagai zat antioksidan, flavonoid berfungsi dalam melawan radikal bebas yang berpotensi merusak tubuh seperti penyakit degeneratif (Ulfah *dkk.*, 2024). Flavonoid berperan dalam aktivitas antioksidan sebagai pendonor hidrogen atau elektronnya kepada

radikal bebas sehingga dapat menstabilkan senyawa radikal, semakin banyak flavonoid dalam ekstrak, maka aktivitas antioksidannya akan semakin meningkat (Dewi, Ulya dan Argo, 2018).



Gambar 2 Mekanisme Peredaman Radikal oleh Flavonoid

Sumber : Artati dkk. (2024)

Flavonoid berpotensi sebagai antioksidan karena mempunyai gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik yang mampu menangkap radikal bebas yang terbentuk akibat reaksi peroksidasi lemak (Artati *dkk.*, 2024). Flavonoid adalah senyawa polifenol dengan 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆, yaitu dua cincin benzene (C₆) yang saling terhubung dengan rantai alifatik tiga karbon (C₃) (Wang, Li dan Bi, 2018).

Flavonoid terdiri dari beberapa subkelas utama yang dibedakan oleh struktur cincin C dan tingkat oksidasi. Subkelas ini mencakup flavanol, flavanon, flavon, isoflavon, antosianidin, serta flavonol. Flavanol, seperti katekin, banyak terdapat dalam teh dan anggur merah. Flavanon, misalnya naringenin, umumnya ada pada buah citrus. Flavon, contohnya apigenin, ditemukan pada daun seledri, ketumbar, dan tanaman herbal berdaun hijau. Isoflavon, seperti genistein dan daidzein, banyak terkandung dalam kedelai. Antosianidin memberikan warna merah, ungu, atau biru pada buah seperti blueberry dan blackberry. Flavonol, misalnya *quercetin* dan

kaempferol, terdapat hampir di semua buah, sayuran, serta tanaman obat berdaun hijau (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Peran dari senyawa flavonoid adalah menghasilkan pigmen berwarna kuning, merah, oranye, biru, dan ungu dari daun, bunga, serta buah. Flavonoid termasuk polifenol yang dapat larut dalam air (Arifin dan Ibrahim, 2018). Menurut Rissa (2022) pada penelitiannya menggunakan ekstrak daun salam menyatakan bahwa senyawa glikosida flavonoid dalam ekstrak daun salam berperan dalam menangkap radikal bebas atau hidroksil yang dapat merusak sel β pankreas sehingga mencegah reaksi diabetogenik akibat penginduksi aloksan. Dengan meningkatkan sekresi insulin yang sensitif terhadap glukosa, flavonoid bekerja secara langsung pada sel β pankreas melalui aktivitas kaskade pensinyalan cAMP.

Flavonoid total merupakan jumlah keseluruhan senyawa metabolit sekunder dari suatu tanaman yang didapatkan dengan metode ekstraksi serta hasilnya dihitung sebagai *Quercetin Equivalent* (mg QE/g ekstrak) (Mustofa dkk., 2023). Kuersetin merupakan jenis flavonol yang paling sering diteliti dan dikenal memiliki kemampuan antioksidan yang sangat kuat. Kuersetin mampu menghambat oksidasi *low-density lipoprotein* (LDL) dengan menyerap radikal bebas dan mengikat ion transisi. Aktivitas ini membantu menurunkan risiko penyakit degeneratif contohnya kanker, aterosklerosis, dan inflamasi kronis (Arifin dan Ibrahim, 2018).

Metode kolorimetri digunakan dalam analisis flavonoid total, dengan prinsip pembentukan warna akibat terbentuknya senyawa kompleks antara $AlCl_3$ dan gugus keton pada atom C-3 atau C-5 yang berdekatan dengan flavonol dan flavon, kemudian diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Kuersetin digunakan sebagai standar karena memiliki gugus keton di

atom C-4 dan gugus hidroksi yang berdekatan pada atom C-3 dan C-5 (Pratiwi, Utami dan Pratimasari, 2022). Analisis dimulai dengan membuat kurva kalibrasi memakai standar kuersetin pada beberapa konsentrasi untuk mendapatkan persamaan regresi. Sampel ekstrak selanjutnya direaksikan dengan larutan $AlCl_3$ dan dibiarkan selama periode inkubasi tertentu sampai kompleks terbentuk sepenuhnya. Setelah itu, pengukuran absorbansi sampel dilakukan dan hasilnya dihitung sebagai *Quercetin Equivalent* (mg QE/g ekstrak) dengan menggunakan persamaan kurva standar. Metode ini sering digunakan karena sederhana, sensitif, dan dapat merepresentasikan total kadar flavonoid dalam ekstrak tumbuhan tertentu (Erwiyani, Gultom dan Oktianti, 2021).

D. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif dan tidak stabil karena mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan di orbit luar. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya agar mendapatkan pasangan elektron untuk mencapai kestabilan. Reaksi ini terus terjadi dalam tubuh dan jika tidak dihentikan akan mengakibatkan berbagai penyakit seperti penuaan dini, kanker, penyakit hati, dan penyakit degeneratif lainnya (Artati dkk., 2024)

Di dalam tubuh, radikal bebas dihasilkan agar dapat menjalankan fungsi biologis penting seperti melawan peradangan, membunuh bakteri, serta mengatur tonus otot polos, pembuluh darah dan organ-organ dalam tubuh, fagositosis, pertumbuhan sel, serta sinyal antar sel. Namun, jika jumlahnya terlalu banyak, radikal yang sangat reaktif bisa memicu reaksi berantai pada saat pembentukannya, hal ini dapat menghasilkan senyawa abnormal yang dapat menimbulkan stres oksidatif atau merusak sel-sel vital, dari tingkat sel, jaringan, hingga organ yang

menyebabkan proses penuaan lebih cepat dan dapat memunculkan beragam penyakit degeneratif (Amin, 2022).

Radikal bebas dapat dibagi menjadi dua kategori utama, yaitu Spesies Oksigen Reaktif (*Reactive Oxygen Species*/ROS) dan Spesies Nitrogen Reaktif (*Reactive Nitrogen Species*/RNS). ROS mampu berinteraksi dengan *Nitric Oxide* (NO) dan memicu disfungsi endotel. NO mudah bereaksi dengan berbagai macam ROS, terutama *Anion Superoksida* (O_2^-), sehingga terbentuk *Peroksinitrit* ($ONOO^-$). Pembentukan $ONOO^-$ ini dapat meningkatkan stres nitrosatif dan menghambat fungsi fisiologis tubuh. *Nitric oxide* (NO) merupakan salah satu radikal dari kelompok RNS (Suryani dkk., 2023).

Di dalam tubuh, radikal bebas muncul akibat produk sampingan dari proses oksidasi dan pembakaran sel selama pernapasan, metabolisme sel, aktivitas fisik berlebihan, peradangan dalam tubuh, serta paparan polusi eksternal contohnya asap rokok dan kendaraan. Superoksida merupakan radikal bebas yang paling umum terbentuk di dalam tubuh dan dapat diubah menjadi peroksida hidrogen (H_2O_2) serta radikal hidroksil ($*OH$). Radikal hidroksil selanjutnya memicu peroksidasi lemak pada membran sel yang menyebabkan kerusakan sel. Kondisi ini, apabila berlangsung terus-menerus, dapat menimbulkan ketidakseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan endogen yang dikenal sebagai stres oksidatif (Maharani dkk., 2021).

E. Antioksidan

1. Definisi antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkap atau menetralkan radikal bebas, dan berperan dalam pencegahan berbagai penyakit degeneratif. Secara

struktural, antioksidan dapat menyumbangkan elektron pada radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya, dan dapat menghentikan reaksi berantai yang dipicu oleh radikal bebas (Pratiwi dkk., 2023).

Dismutase superoksida, katalase, dan peroksiredoksin adalah contoh antioksidan dengan senyawa kompleks. Sedangkan senyawa sederhana dari antioksidan meliputi glutathione, sejumlah vitamin (A, C, E, dan β -karoten), serta senyawa lainnya meliputi flavonoid, albumin, bilirubin, dan seruplasmin. Antioksidan non-enzim dapat bersumber dari senyawa nutrisi maupun bukan nutrisi, misalnya seperti sayuran, buah-buahan, biji-bijian, serta kacang-kacangan (Pratiwi dkk., 2023).

2. Jenis antioksidan

Menurut Suryani dkk. (2023) berdasarkan sumbernya antioksidan terbagi menjadi dua yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Antioksidan endogen adalah antioksidan alami yang diproduksi oleh tubuh secara intraseluler maupun ekstraseluler, seperti *Superoxide Dismutase* (SOD), *Glutathione Peroxidase* (GPx) dan *Catalase* (Cat). Agar kebutuhan antioksidan pada tubuh terpenuhi dalam menangkal radikal bebas, maka diperlukan antioksidan tambahan dari luar tubuh yang disebut dengan antioksidan eksogen.

Antioksidan eksogen bersumber dari antioksidan alami dan antioksidan buatan. Antioksidan alami diperoleh dari ekstrak bahan alami, contohnya yaitu vitamin A, E dan B2, karotenoid, tiamin, seng, selenium, protein gliadin, glutathione, serta senyawa bioaktif seperti flavonoid, fenolat (tiosianat, hidroksil, fenolat, asam galat, asam ellagat), dan tanin (asam galat, asam ellagat). Sedangkan antioksidan buatan merupakan antioksidan yang diperoleh dari sintesis reaksi kimia yang jika

dikonsumsi berlebihan dapat bersifat karsinogenik, misalnya *Ters-Buthyl Hydroquinone* (TBHQ), *Buthylated Hidroksianisol* (BHA), *Buthylated Hydroxytoluene* (BHT), dan Propil Galat (PG) (Kurniawan dan Sutoyo, 2021).

3. Mekanisme antioksidan

Mekanisme antioksidan yaitu melalui pemindahan atom hidrogen dan pemindahan elektron. Antioksidan berperan bagi makhluk hidup untuk melindungi biomolekul meliputi protein, asam nukleat, lemak tak jenuh ganda, dan gula dari kerusakan. Menurut Nurkhasanah, Bachri dan Yuliani (2023) berdasarkan fungsinya, antioksidan memiliki beberapa mekanisme yang bisa diklasifikasikan ke dalam tiga jenis:

a. Antioksidan primer

Antioksidan tipe ini berfungsi dalam menghambat terbentuknya radikal bebas baru dengan cara menghentikan reaksi berantai (propagasi) serta menstabilkan molekul reaktif. Contoh-contoh antioksidan primer yang tergolong dalam kelompok ini yaitu *Superoksida Dismutase* (SOD), katalase, dan *Glutation Peroksidase* (GPx).

b. Antioksidan sekunder

Antioksidan ini berfungsi menghentikan reaksi berantai melalui penangkapan radikal bebas. Senyawa yang termasuk antara lain β -karoten, vitamin E, dan vitamin C yang berfungsi dalam menjaga sel dari kerusakan, membantu proses perbaikan jaringan, serta mendukung sintesis kolagen. Sementara itu, vitamin E berfungsi mengurangi proses inflamasi sekaligus memperkuat sistem pertahanan tubuh.

c. Antioksidan tersier

Antioksidan jenis ini sering disebut *repair enzyme* karena berfungsi untuk memulihkan kerusakan sel dan jaringan akibat radikal bebas di dalam tubuh. Beberapa enzim yang termasuk dalam kategori antioksidan tersier antara lain metionin sulfosida reduktase, DNA *repair enzyme*, protease, transferase, serta lipase. Enzim-enzim tersebut diketahui memiliki peran penting dalam mekanisme perbaikan dan pemeliharaan fungsi sel.

4. Metode uji aktivitas antioksidan

a. Metode DPPH (*2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl*)

Metode DPPH adalah metode analisis antioksidan yang paling sering diterapkan sebagai pengukur aktivitas antioksidan, karena larutan DPPH berperan sebagai radikal bebas dan tidak memerlukan substrat pada metode ini (Anggraeni *dkk.*, 2025). DPPH adalah radikal bebas stabil yang berubah warna jika bereaksi dengan senyawa antioksidan yang kemudian diukur dengan spektrofotometri. Metode ini sangat peka terhadap senyawa penangkap radikal bebas, sehingga menyediakan informasi yang akurat tentang aktivitas antioksidan. Metode DPPH dapat digunakan pada sampel padat maupun cair, namun tidak bersifat spesifik terhadap satu jenis senyawa antioksidan, karena metode ini mengukur aktivitas gabungan dari berbagai komponen seperti flavonoid, senyawa fenolik, vitamin C, vitamin E, dan senyawa antioksidan lainnya yang terdapat dalam sampel. Metode ini menilai kapasitas antioksidan keseluruhan dari sampel dengan mengukur reaksi penangkapan proton oleh DPPH dari senyawa antioksidan (Theafelicia dan Wulan, 2023).

Aktivitas antioksidan pada sampel terlihat dari perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning akibat reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan menjadi DPPH-H. Terjadinya perubahan warna ini menunjukkan kekuatan aktivitas antioksidan pada sampel saat diukur intensitasnya menggunakan spektrofotometri pada panjang gelombang maksimum (Theafelicia dan Wulan, 2023).

b. IC_{50} (*Inhibition Concentration*)

Nilai IC_{50} adalah konsentrasi senyawa uji yang dapat menghilangkan radikal bebas sebanyak 50%. Nilai IC_{50} dimanfaatkan untuk menilai potensi antioksidan suatu senyawa. Senyawa dengan IC_{50} kurang dari 50 mg/L tergolong sangat kuat, 50-100 mg/L masuk dalam kategori kuat, 100-150 mg/L termasuk kategori sedang, 150-200 mg/L termasuk kategori lemah, > 200 mg/L termasuk katagori sangat lemah (Sundoro dkk., 2024). Nilai IC_{50} pada sampel bisa dihitung setelah diperoleh persamaan dari regresi linier antara konsentrasi sampel uji pada sumbu x dengan kemampuan penghambatan DPPH (%) dari tiap sampel pada sumbu y. Nilai IC_{50} yang lebih kecil menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya lebih tinggi (Septiani, Gatera dan Ratnasari, 2022).

Tabel 1
Kategori Nilai IC_{50} terhadap Aktivitas Antioksidan

Nilai IC_{50} (ppm)	Aktivitas Antioksidan
<50	Sangat kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah
>200	Sangat lemah

Sumber: Sundoro dkk. (2024)

c. AAI (*Antioxidant Activity Index*)

Nilai AAI (*Antioxidant Activity Index*) mencerminkan seberapa kuat suatu senyawa bertindak sebagai antioksidan. Nilai AAI ditentukan melalui perbandingan antara konsentrasi DPPH dan nilai IC_{50} . Kategori kekuatan antioksidan terbagi menjadi empat, yaitu: lemah apabila $AAI < 0,5$, sedang apabila $AAI 0,5-1$, kuat apabila $AAI 1-2$, dan sangat kuat apabila $AAI > 2$ (Mamay, Wardani dan Hakim, 2022).

Tabel 2
Kategori Nilai AAI terhadap Aktivitas Antioksidan

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

Sumber: Mamay, Wardani dan Hakim (2022)

F. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah teknis analisis yang memanfaatkan panjang gelombang UV dan *Visible* sebagai area penyerapan untuk mendeteksi senyawa. Secara umum, senyawa yang dapat dianalisis dengan spektrofotometri UV-Vis yaitu senyawa yang mempunyai gugus kromofor dan auksokrom. Selain itu, penggunaan spektrofotometri UV-Vis tergolong cepat dibandingkan metode analisis lainnya (Sahumena *dkk.*, 2020). Prinsip kerja spektrofotometri UV- Vis didasarkan pada penyerapan cahaya oleh atom dan molekul saat berinteraksi dengan cahaya. Ketika sinar monokromatik melewati suatu senyawa maka sebagian sinar akan diserap, sebagian dipantulkan, dan sebagian dipancarkan, sesuai dengan

hukum *Lambert-Beer*. Pemantulan, penyerapan, dan pemancaran cahaya oleh suatu material terjadi karena material tersebut menyerap energi maupun pengaruh dari suhu tinggi (Triastuti *dkk.*, 2023).

Pada spektrofotometri UV-Vis, nilai absorbansi dipengaruhi oleh kadar zat dalam suatu sampel, semakin banyak molekul yang menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu, maka semakin besar nilai absorbansinya. Dengan demikian, absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi zat dalam suatu sampel (Mubarakah dan Mira Kusumaningtyas, 2023). Keunggulan spektrofotometri UV-Vis terletak pada kemampuannya menganalisis senyawa organik maupun anorganik, metode ini juga memberikan cara yang sederhana dan cepat untuk menentukan kadar zat dalam jumlah yang sangat kecil, dengan akurasi tinggi yang hasilnya dapat langsung dibaca oleh detektor dan ditampilkan dalam bentuk angka digital atau grafik hasil regresi (Nurwanti *dkk.*, 2024).

Spektrofotometri UV-Vis dapat dimanfaatkan sebagai penentu kadar flavonoid karena flavonoid mempunyai sistem karbonil yang terkonjugasi dengan cincin aromatik, oleh karena itu karakterisasi flavonoid dapat dianalisis secara spektrofotometri (Nurwanti *dkk.*, 2024). Uji aktivitas antioksidan juga menggunakan Spektrofotometri UV-Vis sebab Spektrofotometri UV-Vis mampu mengukur secara akurat penurunan intensitas absorbansi radikal setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan.