

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antioksidan berfungsi untuk menetralkan radikal bebas sehingga tubuh terlindungi dari berbagai macam penyakit degeneratif. Tubuh memerlukan antioksidan eksogen (antioksidan dari luar tubuh) untuk menghindari terjadinya paparan radikal bebas dikarenakan tubuh tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah banyak (Lestari *et al.*, 2021). Berbagai tumbuhan yang ada di Indonesia memiliki aktivitas antioksidan, dua diantaranya yaitu daun mangga (*Mangifera indica* L.) dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.).

Ekstrak daun mangga memiliki kandungan fenol dan flavonoid total yang lebih tinggi dibandingkan dengan kulit batang dan kulit buah (Marliani *et al.*, 2016). Beberapa penelitian juga menyatakan bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol 96% daun mangga adalah 50,54 ppm (Manggala *et al.*, 2017); 83,73 ppm (Kurniawati *et al.*, 2021); 83,61 ppm (Lestari *et al.*, 2021); dan ekstrak metanol 96% daun mangga sebesar 3,263 ppm (Pamungkas *et al.*, 2017).

Sementara itu, ekstrak etanol buah mengkudu terbukti memiliki kadar fenol sebesar $1,82 \pm 0,02\%$ dan kadar flavonoid sebesar $2,19 \pm 0,04\%$ (Ida *et al.*, 2015). Beberapa penelitian juga menyatakan bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol 96% buah mengkudu bervariasi seperti 9,839 µg/mL (Rosida *et al.*, 2020), 635 µg/mL (Wigati *et al.*, 2016), 25,700 µg/mL (Rahmawati *et al.*, 2015), sedangkan ekstrak metanol 96% buah mengkudu memiliki 96,20 µg/mL (Ruhomally *et al.*, 2016) dan 206,26 µg/mL (Dewi *et al.*, 2022).

Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun mangga dan buah mengkudu masing-masing memiliki tingkat aktivitas antioksidan yang tinggi. Namun, apabila kedua ekstrak tersebut dikombinasikan, terdapat potensi untuk meningkatkan aktivitas antioksidan secara keseluruhan. Temuan ini diperkuat oleh hasil penelitian yang melibatkan kombinasi ekstrak etanol 96% dari daun jarong dan batang cente dengan perbandingan 1:2 (satu bagian kombinasi setara

dengan 1 g ekstrak). Hasil penelitian menunjukkan bahwa kombinasi tersebut menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 18,86 $\mu\text{g/mL}$, yang lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak daun jarong tunggal yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 25,20 $\mu\text{g/mL}$, dan ekstrak batang cente tunggal dengan nilai IC_{50} sebesar 24,05 $\mu\text{g/mL}$ (Septiana *et al.*, 2020).

Berdasarkan beberapa penelitian, kombinasi ekstrak juga dapat mengakibatkan efek aditif dan efek antagonis. Konfirmasi terhadap hal ini didapatkan melalui penelitian yang melibatkan kombinasi ekstrak etanol dari rimpang temu giring dan daun pugun tanoh. Perbandingan 1:1 dan 1:2 dari ekstrak etanol rimpang temu giring dan daun pugun tanoh menunjukkan efek aditif, yang berarti menghasilkan peningkatan aktivitas antioksidan dari salah satu ekstrak yang dikombinasikan. Sebaliknya, ekstrak etanol dari rimpang temu giring dan daun pugun tanoh dengan perbandingan 2:1 menunjukkan efek antagonis. Pengaruh tersebut diduga disebabkan oleh interaksi antara senyawa-senyawa kimia yang terkandung dalam masing-masing ekstrak. (Marianne *et al.*, 2018).

Pada literatur yang ada, belum terdapat penelitian sebelumnya yang membahas potensi dari kombinasi ekstrak daun mangga dan buah mengkudu. Sejalan dengan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi potensi aktivitas antioksidan yang mungkin terkandung dalam kombinasi kedua ekstrak tersebut. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menetapkan kadar fenol dan flavonoid yang berperan dalam aktivitas antioksidan dari kombinasi kedua ekstrak. Dengan menggunakan pendekatan ilmiah, diharapkan penelitian ini dapat memberikan kontribusi signifikan terhadap pemahaman mengenai potensi sinergis, aditif maupun antagonis antara komponen-komponen aktif dalam ekstrak daun mangga dan buah mengkudu.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah kandungan metabolit sekunder dari ekstrak daun mangga dan buah

mengkudu?

2. Berapakah kadar flavonoid dan fenol total dari ekstrak daun mangga?
3. Berapakah kadar flavonoid dan fenol total dari ekstrak buah mengkudu?
4. Apakah kategori interaksi aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun mangga dan buah mengkudu?

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan pada penelitian adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari ekstrak daun mangga dan buah mengkudu
2. Untuk mengetahui kadar flavonoid dan fenol total dari ekstrak daun mangga
3. Untuk mengetahui kadar flavonoid dan fenol total dari ekstrak buah mengkudu
4. Untuk mengetahui kategori interaksi aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak daun mangga dan buah mengkudu.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dalam pengembangan ilmu kefarmasian mengenai pemanfaatan ekstrak daun mangga (*Mangifera indica* L.) dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai antioksidan.

1.4.2 Manfaat praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat dan mendukung pemanfaatan daun mangga (*Mangifera indica* L.) dan buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai antioksidan.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Mangga (*Mangifera indica* L.)



Sumber : Tiara (2021)

Gambar 2.1: Daun Mangga

Adapun klasifikasi mangga, yaitu:

Kingdom : *Plantae*
Class : *Mangoliopsida*
Phylum : *Mangoliophyta*
Order : *Sapindales*
Family : *Anacardiaceae*
Genus : *Mangifera*
Species : *Mangifera indica* L

Sumber : (Sudarsono, 2015)

Mangga (*Mangifera indica* L. var. *arum manis*) adalah tanaman tahunan (*perennial plants*) berupa pohon berbatang keras. Tanaman mangga terdiri dari akar, batang, bunga, dan daun. Akar tunggang pohon mangga sangat panjang, dapat mencapai 6 m dalamnya dan akan berhenti memanjang jika telah mencapai permukaan air tanah. Kulit batangnya tebal dan kasar dengan banyak celah-celah kecil dan sisik-sisik bekas tangkai daun. Bunga mangga menghasilkan buah dan biji yang secara *generative* dapat tumbuh menjadi tanaman baru. Panjang bunga mangga dapat mencapai 12-49 cm dengan diameter 10-43 cm. Bentuk daun mangga yaitu berdaun tunggal, dengan letak tersebar, tanpa daun penumpu. Panjang tangkai daun bervariasi dari 1,25-12,5 cm. Helai daun bervariasi namun kebanyakan berbentuk jorong sampai lanset. Daun

yang masih muda biasanya berwarna kemerahan, keunguan atau kekuningan, yang dikemudian hari akan berubah pada permukaan bagian atas menjadi hijau mengkilat sedangkan bagian bawah berwarna hijau muda (Meti *et al.*, 2021).

Daun mangga bermanfaat untuk menyembuhkan berbagai penyakit, terutama sebagai obat diabetes, tonik darah, hepatitis dan penyembuhan luka. Flavonoid dan polifenol digunakan sebagai antioksidan, steroid sebagai penyuplai hormon, asam galat digunakan sebagai antijamur dan antivirus, serta tanin sebagai obat diare (Ali *et al.*, 2020).

2.2 Aktivitas Antioksidan Daun Mangga

Stres oksidatif terjadi ketika keseimbangan antara antioksidan dan ROS terganggu akibat penurunan kadar antioksidan atau penumpukan ROS. Saat mengalami stres oksidatif, sel berupaya melawan dampak oksidan dengan mengembalikan keseimbangan redoks. Stres oksidatif dapat menyebabkan kerusakan pada sel, khususnya pada DNA, lipid, dan protein. Seiring berjalannya waktu, stres oksidatif dapat meningkatkan risiko terkena kanker dan memperburuk peradangan. Mangiferin diyakini memiliki peran dalam mengatur jalur detoksifikasi Nrf2/ antioksidan elemen respons (ARE), melakukan detoksifikasi langsung terhadap spesies reaktif, dan mengaktifkan enzim detoksifikasi seperti katalase (Gold-Smith *et al.*, 2016).

Selain mangiferin, daun mangga juga mengandung senyawa kimia antosianin, dimana kandungan antosianin ini dapat ditemukan pada batang, kulit buah, dan daun mangga. Antosianin merupakan senyawa bioaktif yang dapat berfungsi sebagai penangkal radikal bebas alami atau biasa disebut dengan senyawa antioksidan alami. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi kestabilan antosianin sehingga dapat mempengaruhi aktivitas antioksidannya antara lain pH, suhu dan enzim. Struktur antosianin dipengaruhi pH dimana akan lebih stabil berada dalam suasana asam dibandingkan suasana basa (Joseph *et al.*, 2021).

Perbedaan letak daun pada ranting juga dapat memberikan pengaruh nyata pada aktivitas antioksidan. Dalam hal ini, pucuk daun mangga dikatakan memiliki aktivitas antioksidan dalam kategori sangat kuat dengan nilai IC_{50} 25,91 ppm dibandingkan dengan daun mangga muda, daun mangga agak tua dan daun

mangga tua. Kandungan fenolik dan flavonoid yang semakin kecil maka akan menghasilkan nilai IC_{50} semakin besar dan terdapat banyak kandungan yang diperlukan dalam menghambat radikal bebas. Kandungan fenol pada daun berhubungan dengan aktivitas antioksidan (Pulungan *et al.*, 2022).

Ekstrak daun mangga yang diujikan menggunakan metode DPPH memiliki nilai AAI $4,5 \pm 0,4 \mu\text{g}$ dan nilai IC_{50} $104 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$. Aktivitas antioksidan dikatakan sangat kuat ketika nilai AAI $> 2,0$. dengan demikian, ekstrak daun mangga memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (Garcia *et al.*, 2022).

2.3 Tanaman Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.)



Sumber : Cici (2015)

Gambar 2.2: Buah Mengkudu

Adapun klasifikasi mengkudu, yaitu:

Kingdom	: Plantae
Devisi	: Magnoliophyta
Subdevisi	: Angiospermae
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Asteroideae
Ordo	: Rubiales
Family	: Rubiaceae
Genus	: Morinda
Spesies	: Morinda citrifolia, L.

Sumber : (Norskov – Lauritsen *et al.*, 2006)

Morinda citrifolia (mengkudu) merupakan salah satu tanaman tropis yang banyak digunakan oleh masyarakat. Tanaman mengkudu merupakan

tanaman yang tumbuh di daerah pedesaan dan masih disepelekan oleh masyarakat dan belum sepenuhnya dibudidayakan. Beberapa spesies mengkudu di Indonesia adalah *M. citrifolia*, *M. eliptica*, *M. bracteate*, *M. speciosa*, *M. linctoria* dan *M. oleifera*. Dari beberapa spesies tersebut, yang paling banyak dimanfaatkan di Indonesia adalah *Morinda citrifolia* dan *Morinda bracteate* (Dina dkk. 2022).

Bunga mengkudu berbentuk tabung bulat dengan di atasnya terdapat bunga putih kecil, harum. Saat bunga rontok, kelopak bunga membengkak dan kemudian membesar menjadi buah mengkudu. Buah mengkudu berdiameter 7,5 cm-10 cm dan berbentuk bulat lonjong seperti telur ayam. Permukaan buah berbintik-bintik dan berwarna hijau. Menjelang matang, buah berubah warna menjadi putih kekuningan. Setelah matang warnanya berubah menjadi putih transparan dan lunak. Buah mengkudu yang sudah matang memiliki rasa dan bau yang tidak sedap (Taufik dkk. 2002).

Tanaman mengkudu sering digunakan dalam berbagai kombinasi untuk obat herbal dan digunakan dalam mengobati berbagai jenis penyakit seperti arthritis, diabetes, hipertensi, analgesik, antibakteri, anti-inflamasi, dan antioksidan (Sogandi and Rabima, 2019).

2.4 Aktivitas Antioksidan Buah Mengkudu

Fraksi kloroform buah mengkudu memiliki aktivitas antioksidan yang mengandung antrakuinon, alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, saponin, dan fenolik. Kemampuan fraksi kloroform ekstrak buah mengkudu sebagai antioksidan terjadi karena adanya kandungan berupa senyawa *n-hexadecanoic acid*, *squalene*, *pyridine-3-carboxamide*, dan *beta-sitosterol*. Senyawa *n-hexadecanoic acid* merupakan turunan asam lemak jenuh (Afrianti *et al.*, 2023). Senyawa *pyridine-3-carboxamide* termasuk ke dalam golongan alkaloid yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Senyawa *beta-sitosterol* merupakan golongan sterol atau steroid yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Afrianti *et al.*, 2023).

Kurniati dkk. (2019) menyebutkan bahwa aktivitas antioksidan buah mengkudu pada pemanasan dengan suhu 60°C memiliki nilai $IC_{50} = 365,56$ mg/L dibandingkan dengan pemanasan pada suhu 40°C ($IC_{50} = 759,65$ mg/L), 80°C

($IC_{50} = 672,37$ mg/L), dan suhu $100^{\circ}C$ ($IC_{50} = 927,42$ mg/L). Nilai tersebut menunjukkan bahwa suhu menyebabkan munculnya perbedaan pada nilai aktivitas antioksidan ekstrak mengkudu.

2.5 Interaksi Ekstrak

Interaksi kombinasi ekstrak merujuk pada hubungan antara dua atau lebih ekstrak herbal ketika digunakan secara bersamaan. Hal ini dapat terjadi saat berbagai ekstrak herbal dikombinasikan, dan dapat mengakibatkan efek sinergis, antagonis, atau aditif (Sarasti *et al.*, 2023). Efek sinergi terjadi ketika dua atau lebih bahan atau senyawa bekerja bersama-sama untuk menghasilkan efek yang lebih kuat daripada efek yang dihasilkan oleh masing-masing bahan atau senyawa secara terpisah. Contoh dari efek sinergi adalah pada penelitian yang menguji kombinasi ekstrak jahe dan daun jeruk purut yang menunjukkan efek sinergis dalam uji aktivitas antioksidan (Sarasti *et al.*, 2023).

Efek aditif terjadi ketika dua atau lebih bahan atau senyawa bekerja bersama-sama untuk menghasilkan efek yang sama dengan efek yang dihasilkan oleh masing-masing bahan atau senyawa secara terpisah. Contoh dari efek aditif adalah pada penelitian yang menguji kombinasi ekstrak air secang dan cengkeh yang menunjukkan interaksi adisi pada uji aktivitas antioksidan (Fauziyyah, 2018).

Efek antagonis terjadi ketika dua atau lebih bahan atau senyawa bekerja bersama-sama untuk menghasilkan efek yang lebih lemah daripada efek yang dihasilkan oleh masing-masing bahan atau senyawa secara terpisah. Contoh dari efek antagonis adalah pada penelitian yang melaporkan interaksi antagonis pada kombinasi air jahe dan kayusecang (Fauziyyah, 2018).

Kombinasi ekstrak bertujuan untuk meningkatkan efisiensi pengobatan, dan menurunkan sitotoksitas pada sel normal. Ketika menggabungkan dua atau lebih ekstrak, tujuan utamanya adalah untuk mencapai efek interaksi positif, dengan menunjukkan bukti unggul mengenai kombinasi menguntungkan dari dua atau lebih obat dibandingkan dengan masing-masing obat secara individual (Vale, 2022).

2.6 Antioksidan

Stress oksidatif merupakan kondisi yang terjadi akibat ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan yang ada di dalam tubuh. Demi menghambat pertumbuhan radikal bebas, tubuh secara alami akan menghasilkan antioksidan (Saskiawan, 2015).

Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan, dengan mekanisme pertahanan antioksidan endogen. Bila antioksidan endogen tidak mencukupi, tubuh membutuhkan antioksidan dari luar (antioksidan eksogen) yaitu antioksidan yang didapat dari luar tubuh baik dari makanan maupun minuman. Berbagai bahan alam asli Indonesia banyak mengandung antioksidan dengan berbagai bahan aktifnya antara lain vitamin C, E, Vitamin A, organosulfur, tocopherol, flavonoid, thymoquinone, alkaloid, statin, niasin, phycocyanin dan lain-lain. Berbagai bahan alam, baik yang sudah lama digunakan sebagai makanan sehari-hari atau baru dikembangkan sebagai suplemen makanan yang mengandung antioksidan (Asri, 2014).

Antioksidan dapat diklasifikasikan menjadi tiga kategori berdasarkan mekanisme kerjanya, yakni antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier (Nilawati, 2020). Antioksidan Primer merupakan antioksidan yang bertindak dengan cara mencegah terbentuknya senyawa radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang sudah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif atau memiliki dampak negatif yang berkurang. Antioksidan primer menghambat radikal bebas dengan memutus reaksi berantai (polimerisasi) dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contoh antioksidan primer meliputi vitamin E, vitamin C, dan betakaroten yang dapat diperoleh dari buah-buahan (Pratama *et al.*, 2017).

Antioksidan sekunder atau yang juga disebut sebagai antioksidan preventif dapat mengurangi laju awal reaksi rantai. Jenis antioksidan ini mampu menghambat pembentukan radikal bebas baru dan mengubah radikal bebas yang sudah terbentuk menjadi molekul yang kurang reaktif atau memiliki dampak negatif yang berkurang. Beberapa contoh spesifik termasuk kuersetin, kaempferol (flavonoid), lutein, zeaxanthin (karotenoid), serta resveratrol (polifenol), yang dapat ditemukan dalam berbagai jenis makanan seperti buah-buahan, sayuran, teh, dan anggur (Pratama *et al.*, 2017).

Antioksidan tersier merupakan senyawa yang berfungsi untuk memperbaiki sel-sel dan jaringan yang mengalami kerusakan akibat serangan radikal bebas. Selain itu, mereka juga bermanfaat untuk perbaikan inti sel dan DNA pada penderita kanker. Contoh antioksidan tersier termasuk jenis enzim seperti metionin sulfoksidan (Maela, 2018).

Antioksidan juga dapat dikelompokkan menjadi dua kategori, yaitu antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Antioksidan enzimatis mencakup enzim seperti superoksida dismutase, katalase, dan glutathion peroksidase, sementara antioksidan non-enzimatis dibagi menjadi dua kelompok, yaitu antioksidan larut lemak seperti tokoferol, karotenoid, dan quinon, serta antioksidan larut air seperti asam askorbat (Maela, 2018).

2.6.1 Metode uji antioksidan

Pengujian antioksidan biasanya melibatkan pengukuran aktivitas antioksidan zat tertentu atau campuran senyawa. Beberapa pengujian melibatkan pengukuran penangkapan radikal bebas, pengukuran aktivitas antioksidan, atau evaluasi kemampuan suatu zat untuk melindungi sel-sel dari kerusakan oksidatif. Pengujian yang dapat dilakukan yaitu 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), *ferric reduktor antioksidan power* (FRAP), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), dan *oxygen radical absorbance* (ORAC) (Flieger, 2020).

Metode 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) merupakan salah satu metode yang umum digunakan dalam penelitian biokimia dan biologi molekuler. ABTS adalah zat warna yang dapat mengalami oksidasi oleh senyawa-senyawa antioksidan, dan perubahan warna yang dihasilkan dapat diukur untuk menentukan sejauh mana suatu substansi dapat melawan oksidasi. Metode ABTS memiliki keunggulan yaitu memberikan absorbansi spesifik pada panjang gelombang visible dan waktu reaksi yang lebih cepat (Wulansari, 2018). Selain itu, ABTS dapat dilarutkan dalam pelarut organik maupun air sehingga bisa mendeteksi senyawa yang bersifat lipofilik maupun hidrofilik. Namun, pengujian menggunakan ABTS tidak menggambarkan sistem pertahanan tubuh terhadap radikal bebas sehingga ABTS hanya dapat dijadikan sebagai metode pembandingan karena tidak mewakili sistem biologis tubuh serta harga reagen

ABTS yang mahal, sehingga jarang digunakan (Wulandari, 2018).

Metode *ferric reduktor antioksidan power* (FRAP) metode pengujian aktivitas antioksidan yang biasa digunakan untuk mengetahui kandungan antioksidan total dalam tanaman berdasarkan kemampuan dari senyawa antioksidan dalam mereduksi ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} . Metode FRAP memiliki kelebihan yaitu murah, cepat, reagenya mudah diperoleh, prosedurnya. Kelebihan metode ini yaitu cepat, rendah biaya, dapat digunakan untuk antioksidan yang bersifat hidrofilik maupun hidrofobik serta signifikan secara fisiologis. Kekurangan dari metode ini yaitu sulit dalam praktiknya, sensitif terhadap suhu rendah sehingga mempengaruhi reproduktifitas pengujian (Aryanti *et al.*, 2021).

2.6.2 DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Pengujian DPPH merupakan salah satu metode yang paling populer dan sering digunakan di antara pengujian antioksidan. Pengujian ini menggunakan cara yang sederhana, efisien, murah, cepat dan membutuhkan sedikit reagen. Namun, seperti kebanyakan pengujian antioksidan, pengujian ini memerlukan spektrofotometer UV- Vis. Metode ini dikembangkan oleh Blois dan dimodifikasi oleh Brand-Wiliams dkk (Angeli *et al.*, 2023).

Prinsip dasar dalam uji antioksidan menggunakan metode DPPH adalah adanya reaksi kimia antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH melalui mekanisme reaksi donasi atau pemberian atom hidrogen oleh senyawa antioksidan ke radikal bebas DPPH yang mengakibatkan adanya perubahan warna larutan dari ungu (DPPH atau DPPH-R) menjadi kuning (DPPH-H) atau dari ungu pekat menjadi ungu pudar. Perubahan warna tersebut menyebabkan penurunan nilai absorbansi sampel.

Inhibition Concentrate 50 (IC_{50}) merupakan suatu jenis parameter yang dapat digunakan dalam mengetahui dan menentukan kekuatan suatu bahan atau senyawa dalam menghambat aktivitas oksidan dari DPPH sebesar 50% (Susanti, 2017). Terdapat empat kategori antioksidan menurut nilai IC_{50} , yaitu $\text{IC}_{50} < 50$ ppm (sangat kuat), $\text{IC}_{50} 50-100$ ppm (kuat), $\text{IC}_{50} 100-250$ ppm (sedang), $\text{IC}_{50} 250-500$ ppm (lemah). Tahapan pengujiannya yaitu masing-masing larutan sampel uji dan standar antioksidan dipipet dan dicampur dengan larutan DPPH

dalam tabung reaksi. Kemudian divortex selama 1 menit dan inkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, absorbansi campuran reaksi diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer untuk mendapatkan nilai absorbansi sampel. Larutan kontrol DPPH adalah larutan DPPH yang dilarutkan dalam etanol dengan tujuan untuk mendapatkan serapan DPPH tanpa gangguan serapan dari senyawa-senyawa lain dalam sampel. Larutan kontrol digunakan sebagai kontrol untuk membandingkan reaksi antioksidan dari senyawa atau larutan lain yang diuji terhadap radikal DPPH. Dengan membandingkan perubahan warna atau absorbansi antara larutan kontrol dan larutan yang diuji, kita dapat mengevaluasi sejauh mana senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan. Selanjutnya dihitung %peredaman untuk setiap larutan dengan rumus berikut

$$\%persentase\ inhibisi = (A\ kontrol - A\ sampel) / (A\ kontrol) \times 100\% \dots\dots\dots(2.1)$$

Keterangan:

A kontrol: absorbansi kontrol (DPPH)

A sampel: absorbansi sampel uji

Berdasarkan nilai %inhibisi yang diperoleh kemudian dibuat kurva terhadap konsentrasi larutan uji atau larutan pembanding. Konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan %inhibisi sebagai sumbu y. Selanjutnya dibuat persamaan regresi linier $y = bx + a$(2.2)

Nilai $y = 50$ dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC_{50} . Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50% (Lestari *et al.*, 2020). Nilai *antioxidant activity index* (AAI) digunakan untuk menggolongkan sifat antioksidan ekstrak dan mengetahui kapasitas atau kemampuan antioksidan ekstrak terhadap DPPH. Nilai AAI 0,5 bermakna antioksidan bersifat sedang; $AAI > 1-2$ bermakna antioksidan bersifat kuat; dan $AAI > 2$ bermakna antioksidan sangat kuat. Nilai AAI didapatkan dengan cara konsentrasi DPPH dibagi dengan Nilai IC_{50} (Clathratus *et al.*, 2016).

2.7 Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk mengukur absorbansi cahaya pada rentang spektrum UV dan cahaya tampak oleh suatu zat kimia dalam larutan. Pada umumnya sampel harus diubah menjadi suatu larutan yang jernih.

Jika sampel sudah berupa larutan, hal yang perlu diperhatikan dalam persyaratan pelarut yang digunakan yaitu sampel harus terlarut sempurna, pelarut yang dipakai tidak mengandung ikatan rangkap terkonjugasi pada struktur molekulnya dan tidak berwarna (agar tidak mengabsorpsi sinar yang dipakai sampel), molekul senyawa yang dianalisis tidak terjadi interaksi, kemurnian wajib tinggi. Agar mendapatkan spektrum UV-Vis yang baik, diperlukan perhatian pada konsentrasi sampel. Hubungan antara absorbansi terhadap konsentrasi akan linier. Bila absorbansi yang dihasilkan masih terlalu tinggi, maka larutan sampel tersebut harus diencerkan. Dan sebaliknya apabila terlalu rendah, maka jumlah sampel harus ditambah (Suhartati, 2017).

Terdapat dua penataan pada spektrofotometer UV-Vis, yaitu spektrofotometer berkas tunggal (*single beam*) yang digunakan di hampir semua sistem spektroskopi emisi dan spektrofotometri berkas ganda (*double beam*) yang digunakan pada hampir semua sistem absorpsi. Pada spektrofotometer berkas ganda, instrument akan menghasilkan suatu berkas sinar radiasi UV-Vis, yang mana dengan adanya cermin, berkas akan terbagi menjadi 2 berkas sinar yang paralel dengan intensitas radiasi yang setara. sampel akan ditempatkan pada salah satu berkas sinar, sedangkan berkas sinar lainnya digunakan sebagai tempat referen, seperti blanko berupa pelarut atau lainnya. berkas sinar selanjutnya dilewatkan ke dalam monokromator yang terdiri atas bagian yang berputar secara cepat dan melewatkan dua berkas sinar secara bergantian ke kisi difraksi (*grating*).

Kisi difraksi kemudian bergerak secara lambat dan melakukan variasi panjang gelombang radiasi yang sampai ke detektor. Detektor akan merekam perbedaan antara berkas sinar dari sampel dan dari referen dalam suatu pencatat (rekorder). Berkas sinar selanjutnya dilewatkan ke dalam monokromator yang terdiri atas bagian yang berputar secara cepat dan melewatkan dua berkas sinar secara bergantian ke kisi difraksi (*grating*). Kisi difraksi kemudian bergerak secara lambat dan melakukan variasi panjang gelombang radiasi yang sampai ke detektor. Detektor akan merekam perbedaan antara berkas sinar dari sampel dan dari referen dalam suatu pencatat (rekorder). Keuntungan spektrofotometer berkas ganda adalah bahwa spektrum UV-Vis yang diperoleh sudah berupa spektrum net. Spektrum net merupakan spektrum yang diperoleh dengan cara

mengurangkan spektrum UV-Vis dengan spektrum blanko (Gandjar *et al.*, 2018.).

Prinsip kerja spektrofotometer berdasarkan Hukum Lambert-Beer yaitu sinar dilewatkan suatu larutan pada panjang gelombang tertentu, sehingga sinar tersebut sebagian ada yang diteruskan dan sebagian lainnya diserap oleh larutan. Dalam hal ini absorbansi memiliki hubungan linear dengan konsentrasi larutan sampel. Konsentrasi dari sampel di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang absorpsi maksimum dari zat yang diukur. dengan menggunakan Hukum Lambert-Beer (Gandjar *et al.*, 2018).

$$A = a \cdot b \cdot C \dots \dots \dots (2.3)$$

Keterangan:

A = Serapan (Absorbansi)

C = Konsentrasi (M)

a = Koefisien serapan spesifik (L/mol cm)

b = Lebar kuvet (cm)

2.8 Aditivitas Respons

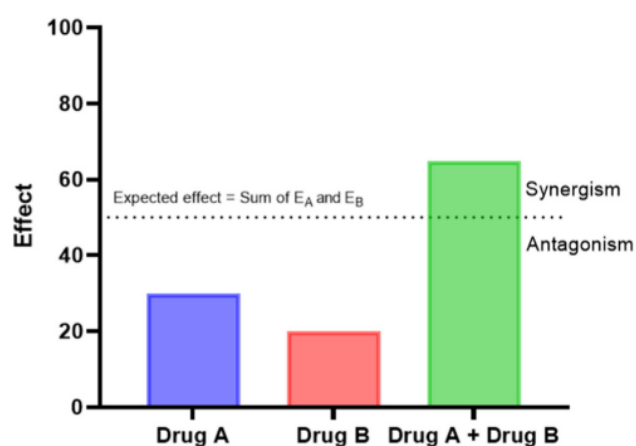
Kombinasi obat adalah menggabungkan dua atau lebih obat, tujuan utamanya adalah untuk mencapai efek interaksi positif, dengan menunjukkan bukti unggul mengenai kombinasi menguntungkan dari dua atau lebih obat dibandingkan dengan masing-masing obat secara individual. Klasifikasi evaluasi interaksi obat dapat dibagi menjadi 2, yaitu berbasis efek dan berbasis dosis-efek. Evaluasi interaksi berbasis efek mencakup empat strategi utama yaitu *Combination Subthresholding*, agen tunggal tertinggi (*highest single agent*), aditivitas respons, dan model independensi bliss (*bliss independence*). Sedangkan evaluasi interaksi berbasis dosis efek mencakup aditivitas loewe dan potensi interaksi nol (ZIP) (Duarte *et al.*, 2022).

Aditivitas respons yang dikenal juga sebagai efek interaksi linier merupakan suatu model matematika yang digunakan untuk menilai kinerja obat dalam bentuk kombinasi. Diagram ini mengilustrasikan dampak dari kombinasi obat. Secara umum, kombinasi obat lebih efektif dibandingkan dengan penjumlahan efek individualnya, yang disebut sebagai sinergi, dan dapat mengalami pelemahan efek terapeutik yang disebut sebagai antagonisme. Sinergi mencerminkan bahwa ketika dua atau lebih komponen dicampur,

efeknya lebih besar daripada jumlah efek masing-masing komponen bila digunakan secara terpisah.

Saat ini, penggunaan obat kombinasi secara klinis umum karena efek terapeutiknya biasanya lebih baik dibandingkan dengan obat tunggal. Meskipun fenomena ini mungkin berasal dari penelitian obat atau pengalaman klinis yang luas dari dokter, perlu dilakukan bukti eksperimental untuk menentukan apakah kedua obat tersebut memiliki efek sinergis (Duarte *et al*, 2022).

Keunggulan aditivitas respons dalam mengevaluasi kombinasi obat melibatkan beberapa aspek. Pertama, memberikan representasi diagram yang intuitif terhadap interaksi antara dua atau lebih obat. Kedua, metode ini memungkinkan penilaian yang jelas terhadap apakah kombinasi obat menunjukkan sinergi, aditif, atau antagonis (Huang *et al.*, 2019). Namun demikian, Penentuan sinergisme menggunakan model ini yang berarti obat tersebut memiliki kurva dosis-efek linier yang tidak berlaku untuk banyak obat yang digunakan dalam studi farmakologi. Aditivitas respons memperlihatkan diagram yang mencerminkan aditivitas teoritis antara obat-obatan tersebut. Interaksi positif terjadi ketika kombinasi obat (EAB) menimbulkan efek yang lebih besar daripada jumlah efek masing-masing obat ($EAB > EA + EB$). Nilai CI (*combination indeks*) digunakan untuk menentukan efek interaksi pada kombinasi obat. Jika nilai CI lebih dari 1 maka kombinasi ekstrak bersifat antagonis dan jika nilai CI kurang dari 1 maka kombinasi ekstrak bersifat sinergis.



Sumber : Huang (2019)

Gambar 2.3: Aditivitas Respons

2.9 Analisis Statistik

Statistik dalam penelitian merupakan alat atau metode yang digunakan untuk mengumpulkan, menganalisis, dan menginterpretasikan data. Fungsi statistik dalam penelitian adalah memberikan dasar yang kuat untuk membuat kesimpulan yang obyektif dan mendukung pengambilan keputusan, berkontribusi dalam pengumpulan dan penyajian data dengan metode yang terorganisir, membantu dalam pemahaman data yang rumit dan kompleks dengan menyederhanakannya, mendukung dalam proses klasifikasi data, menyediakan dasar dan teknik untuk melakukan perbandingan (Hartanto *et al.*, 2019). berdasarkan tahapan yang ada dalam kegiatan statistik dapat dibagi kedalam 2 (dua) bagian yaitu statistik deskriptif dan statistik inferensial.

Statistik deskriptif sering disebut sebagai statistik deduktif atau statistik sederhana, merupakan cabang statistik yang fokus pada proses pengumpulan, penyusunan atau pengaturan, pengolahan, penyajian, dan analisis data numerik. Tujuannya adalah untuk memberikan gambaran yang terstruktur, singkat, dan jelas mengenai suatu fenomena, peristiwa, atau kondisi (Hartanto *et al.*, 2019).

Statistik inferensial, yang juga dikenal sebagai statistik induktif atau statistik lanjut, adalah cabang statistik yang memberikan pedoman atau metode sebagai sarana untuk mencoba membuat kesimpulan umum dari sekelompok data yang telah dikumpulkan dan diolah. Selain itu, statistik inferensial juga memberikan pedoman khusus untuk penarikan kesimpulan, penyusunan ramalan, penaksiran, dan sebagainya. Dengan demikian, statistik inferensial memiliki sifat yang lebih mendalam dan merupakan kelanjutan dari statistik deskriptif. Statistik deskriptif, sebagai dasar dari ilmu statistik secara keseluruhan, menjadi kunci untuk memahami dan menjelajahi lebih lanjut statistik inferensial (Hartanto *et al.*, 2019).

Statistik parametrik mengandalkan pendugaan dan pengujian hipotesis terkait parameter populasi dengan asumsi bahwa skor yang dianalisis berasal dari suatu populasi yang mengikuti distribusi tertentu. Sedangkan, statistik nonparametrik melakukan pendugaan dan pengujian hipotesis terkait parameter populasi dengan asumsi bahwa skor yang dianalisis berasal dari suatu populasi tanpa mengikuti distribusi tertentu atau dengan distribusi yang tidak ditentukan secara spesifik (Hartanto *et al.*, 2019).

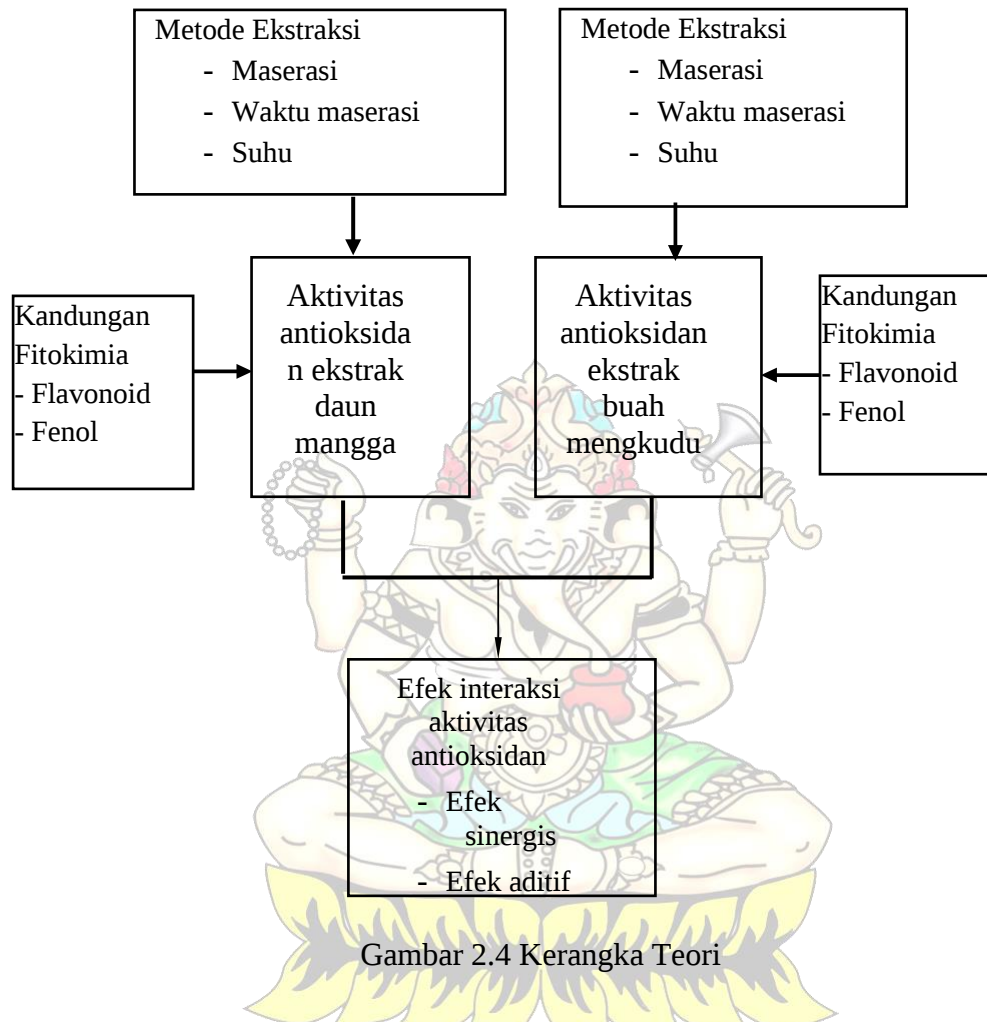
Pada penelitian ini, analisis data dilakukan dengan deskriptif, baik secara kualitatif maupun kuantitatif. Analisis kualitatif bertujuan untuk menggambarkan kandungan fitokimia ekstrak etanol dari daun mangga dan buah mengkudu, sedangkan analisis kuantitatif bertujuan untuk memberikan gambaran lebih rinci melalui grafik, tabel, dan data angka, termasuk kadar total fenol dan flavonoid serta kurva konsentrasi kombinasi ekstrak etanol kedua bahan tersebut dalam penelitian ini (Wulandari *et al.*, 2022).

Penting juga untuk mencatat bahwa pemeriksaan aktivitas antioksidan melibatkan penentuan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk mereduksi 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} , semakin tinggi aktivitas antioksidan (Maesaroh *et al.*, 2018).



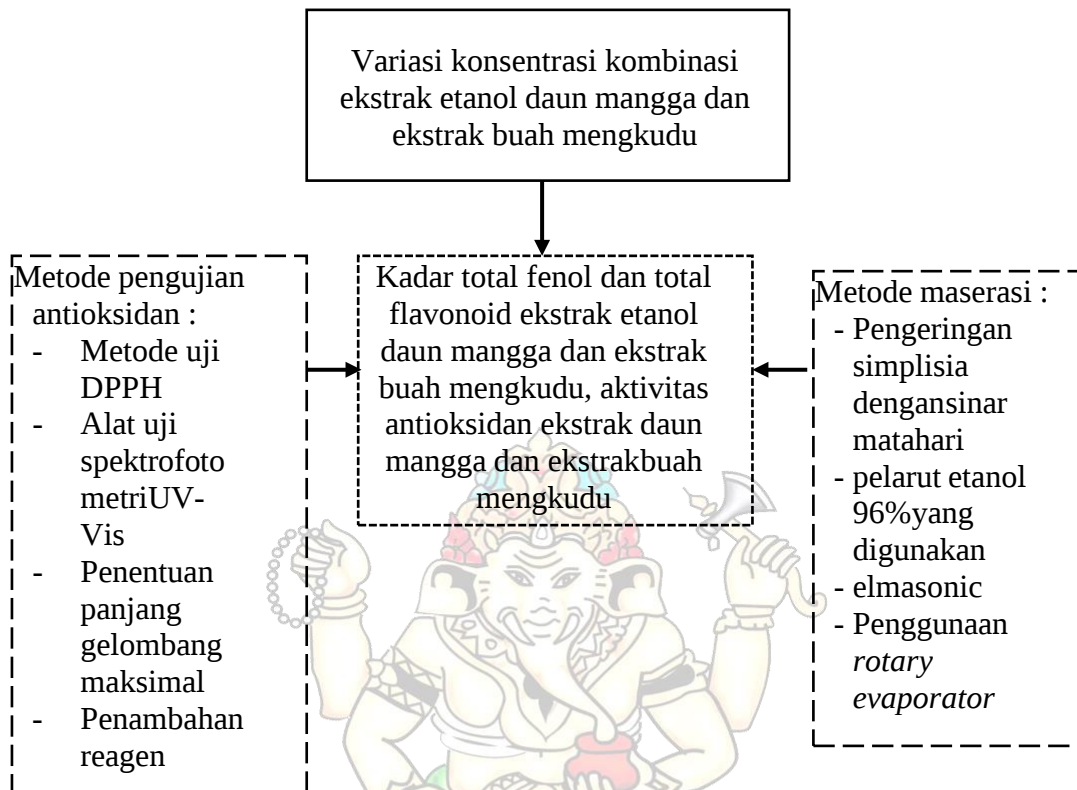
2.10 Kerangka Konseptual

2.10.1 Kerangka teori



Gambar 2.4 Kerangka Teori

2.10.2 Kerangka konsep



Gambar 2.5 Kerangka Konsep

Keterangan :

Variabel Bebas

Variabel Terikat

Variabel Kontrol

2.11 Hipotesis

1. Diduga ekstrak etanol daun mangga dan ekstrak buah mengkudu mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, fenol, dan steroid.
2. Diduga kombinasi ekstrak etanol daun mangga dan ekstrak etanol buah mengkudu menghasilkan interaksi aktivitas antioksidan dengan kategori sinergis.