

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat membantu menyerap atau menetralkan radikal bebas sehingga dapat mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, karsinogenesis, dan penyakit lainnya. Senyawa antioksidan termasuk substansi yang diperlukan oleh tubuh manusia untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas di sel normal, protein, dan lemak. Senyawa antioksidan berstruktur molekul yang memberikan elektronnya kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya dan dapat memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas (Pratiwi dkk., 2023).

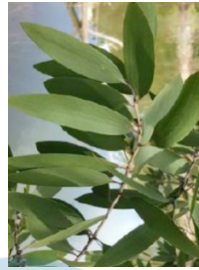
Antioksidan termasuk molekul kompleks, seperti super oksidodismutase, katalase, dan peroksiredoksin, senyawa sederhana, seperti glutathione, vitamin (A, C, E, dan beta karoten), serta senyawa lainnya, seperti flavonoid, albumin, bilirubin, atau seruplasmin (Pratiwi dkk., 2023). Antioksidan alami dapat ditemukan di tumbuhan atau hewan, seperti senyawa fenolik dari golongan flavonoid, kumarin, dan tokoferol. Penggunaan antioksidan alami sebagai alternatif sumber antioksidan yang dapat diperoleh dari tanaman serta sejumlah penelitian menunjukkan bahwa beberapa tanaman herbal dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan karena kemampuannya dalam melindungi tubuh dari potensi bahaya radikal bebas. (Asrifaturofinngah dkk., 2024).

B. Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra* L.)

Kayu putih termasuk dalam famili *Myrtaceae*, yang mencakup lebih dari 300 spesies tanaman dan tersebar luas di berbagai wilayah beriklim tropis maupun hangat di dunia. Spesies *Melaleuca* sendiri berasal dari Australia dan kemudian menyebar ke wilayah Asia bagian selatan, termasuk Indonesia (Meisarani dan Ramadhania, 2016). Menurut Mbodj dkk., (2024), klasifikasi botani tanaman kayu putih adalah:

<i>Kingdom</i>	: Plantae
<i>Subdomain</i>	: Tracheobiota
<i>Division</i>	: Magnoliophyta
<i>Class</i>	: Magnoliopsida
<i>Order</i>	: Myrtales
<i>Family</i>	: <i>Myrtaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Melaleuca</i>

Daun kayu putih memiliki bentuk lanset sempit yang sangat panjang, dengan ukuran sekitar 7,5–27 cm, menjadikannya salah satu daun terpanjang dalam genusnya. Daun ini juga memiliki 5 urat utama yang memanjang di sepanjang permukaannya. Ciri-ciri dari daun kayu putih yang baik adalah memiliki warna hijau segar jika baru dipanen atau hijau kecoklatan jika sudah dikeringkan, memiliki aroma yang khas seperti aroma minyak kayu putih, teksturnya yang lentur dan tidak mudah hancur, dan bebas dari bintik-bintik hitam atau putih yang menunjukkan bebas dari serangan jamur atau serangga. Menurut Wulandari (2022), daun kayu putih dapat dilihat di Gambar 1.



Gambar 1. Daun Kayu Putih (*Melaleuca leucadendra* L.)

Kayu putih merupakan tanaman tradisional yang tumbuh rendah (*low-growing*) dan telah lama dimanfaatkan di Indonesia. Daun kayu putih di Indonesia umumnya diekstraksi untuk memperoleh minyak atsiri yang dimanfaatkan dalam pengobatan herbal, termasuk sebagai antiseptik, antineuralgik, serta bahan dalam pembuatan kosmetik. Selain itu, daunnya sering digunakan dalam mandi anak-anak untuk mencegah penyakit, sementara rebusan daun kayu putih dikonsumsi untuk meredakan gejala influenza. Daun yang diiris tipis juga kerap diaplikasikan pada luka untuk mempercepat penyembuhan (Meisarani dan Ramadhania, 2016).

Secara fitokimia, daun kayu putih mengandung 3 senyawa aktif utama yaitu polifenol, alkaloid, dan flavonoid. Senyawa polifenol dan flavonoid dari daun kayu putih adalah senyawa yang berperan sebagai antioksidan. Ekstrak etanol 70% daun Galam (*Melaleuca cajuputi* Roxb.) dengan ekstraksi maserasi memiliki kadar flavonoid total sebesar 0,3438 mg QE/g ekstrak sedangkan untuk kadar fenolik totalnya sebesar 16,5254 mgGAE/mg ekstrak (Wardhani dkk., 2018). Ekstrak etanol *Tea Tree* (*Melaleuca bracteata*) dengan ekstraksi maserasi memiliki kadar flavonoid total sebesar 21,6 mgQE/g ekstrak sedangkan untuk kadar fenolik totalnya sebesar 98,7 mgGAE/ g ekstrak (Yasin dkk., 2021).

C. Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman

Manfaat dan efek farmakologi dari obat berbahan dasar tanaman adalah salah satu faktor yang sangat diperhatikan dalam pengembangan obat herbal. Efek farmakologi tersebut dibentuk oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung di bagian tertentu dari tanaman yang berpotensi digunakan sebagai obat. Senyawa metabolit sekunder diproduksi secara alami oleh tanaman dalam jumlah yang terbatas dan hanya untuk tujuan yang spesifik, seperti sebagai atraktan untuk menarik organisme lain, pertahanan terhadap patogen, perlindungan dan adaptasi terhadap lingkungan, perlindungan terhadap sinar UV, serta sebagai zat pengatur tumbuh (Nabillah dan Chatri, 2024).

Selain berperan dalam perlindungan dan adaptasi tumbuhan, metabolit sekunder memiliki nilai farmakologi yang penting dalam pengobatan herbal. Berbagai senyawa metabolit sekunder yang sering ditemukan dalam tanaman obat adalah alkaloid, tanin, polifenol, terpen, kuinon, flavonoid, triterpenoid, steroid, dan saponin (Fikayuniar dkk., 2024).

Senyawa fenolik adalah salah satu senyawa alami antioksidan yang tersebar luas di alam sehingga mudah ditemukan di bagian tanaman seperti bunga, daun, dan buah. Senyawa fenolik memiliki cincin aromatik yang memiliki satu atau dua gugus hidroksil sehingga dapat digunakan sebagai senyawa antioksidan untuk pencegahan atau pengobatan penyakit degeneratif seperti kanker, penuaan dini, dan gangguan sistem imun tubuh. Salah satu senyawa dengan golongan terbesar fenolik adalah flavonoid.

Flavonoid adalah salah satu senyawa fenol alami yang dapat ditemukan di hampir semua bagian tumbuhan tetapi hanya dapat disintesis dalam jumlah yang sedikit, sekitar 0,5-1,5%. Senyawa flavonoid juga memiliki potensi yang dapat digunakan sebagai antioksidan karena adanya gugus hidroksil yang terikat di karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi oksidasi lemak. Senyawa flavonoid juga akan menyumbang 1 atom hidrogen untuk membantu menstabilkan radikal peroksi lemak (Khanifah, 2022).

Sebagai senyawa yang dapat berperan sebagai antioksidan, flavonoid memiliki rangkaian afinitas hipotesis terhadap residu asam amino melalui kombinasi gugus hidroksil C3 dengan hidroksil C5 serta ikatan rangkap karbonil C4 dan C2-C3. Struktur tersebut membantu mengoptimalkan kemampuan flavonoid dalam menangkap *Reactive Oxygen Species* (ROS). Aktivitas antioksidan dari flavonoid tergantung dengan pengaturan gugus fungsi struktur inti, susunan, dan jumlah keseluruhan gugus OH yang nantinya akan menstimulasi mekanisme senyawa flavonoid yang dapat berperan sebagai antioksidan. Semakin berkembangnya jaman, banyak penelitian tertarik untuk meneliti lebih lanjut mengenai kandungan senyawa flavonoid pada tumbuhan yang dapat digunakan sebagai antioksidan (Widiasriani dkk., 2024).

Alkaloid adalah salah satu senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan dan dapat ditemukan di beberapa organ tumbuhan seperti daun, kulit batang, ranting, dan biji. Alkaloid memiliki manfaat di bidang kesehatan antara lainnya membantu meningkatkan tekanan darah, pemicu sistem saraf,

mengurangi rasa sakit, menjadi senyawa antimikroba, sebagai obat penenang, obat penyakit jantung, dan manfaat lainnya. Tanin adalah senyawa organik kompleks yang berbentuk metabolit sekunder pada tanaman dan tersusun atas senyawa golongan fenolik yang sulit dikristalkan dan dipisahkan serta kandungan protein yang sulit diendap. Tanin dapat ditemukan di berbagai organ tumbuhan seperti daun, batang, akar, buah, kulit kayu dan termasuk senyawa polifenol yang memiliki aktivitas antibakteri, antioksidan, dan astrigen (Khafid dkk., 2023).

Saponin adalah glikosida yang banyak ditemukan di bagian tumbuhan dengan struktur kimianya yang terdiri atas glikon dan aglikon. Senyawa saponin memiliki berbagai manfaat dalam bidang kesehatan, antara lainnya membantu mengurangi konsentrasi kolesterol dalam darah, memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi, dan berfungsi sebagai senyawa anti-stress dan anti-penuaan. Saponin dapat dikelompokkan menjadi 2 jenis yaitu triterpenoid dan steroid. Triterpenoid adalah senyawa metabolit sekunder turunan terpenoid dengan kerangka karbon yang tersusun atas enam satuan isoprene (*2-metilbuta-1,3-diene*) yang bermanfaat dalam bidang kesehatan untuk antikanker, antioksidan, antiinflamasi, serta mencegah berbagai penyakit seperti obesitas, hipertensi, dan diabetes. Steroid adalah senyawa metabolit sekunder di tumbuhan yang dikategorikan sebagai kelas utama fitokimia selain fenolik, terpenoid, minyak esensial, alkaloid, dan polipeptida (Khafid dkk., 2023).

D. Ekstraksi secara Maserasi

Ekstraksi adalah metode untuk mendapatkan komponen pada suatu bahan agar terpisah dari bahan induknya. Ekstraksi termasuk metode yang sering dilakukan untuk mendapatkan metabolit sekunder dari tanaman herbal. Ekstraksi dilakukan untuk memperoleh senyawa aktif yang optimal dan kualitas yang baik. Metode ekstraksi memiliki bermacam-macam tipe metode sesuai dengan kebutuhan metabolit sekunder yang diinginkan, antara lainnya metode maserasi, sokletasi, reflux, destilasi, dan *successive extraction*. Rendemen dari ekstrak yang terhasil dapat berbeda-beda karena dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lainnya seperti metode ekstraksi, pelarut, waktu, dan suhu ekstraksi (Adnyani dkk., 2024).

Maserasi adalah salah satu metode pemisahan senyawa dengan cara perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada temperatur tertentu. Proses maserasi sangat membantu untuk isolasi senyawa bahan alam karena sampel tumbuhan ketika direndam akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma dari tumbuhan akan terlarut dalam pelarut yang sesuai. Proses maserasi dipengaruhi oleh suhu, waktu, dan jenis pelarut yang digunakan sehingga semakin tepat maka kadar senyawa metabolit sekundernya akan semakin meningkat (Fakhruzy dkk., 2020).

Etanol adalah alkohol yang digunakan sebagai pelarut semi-polar. Etanol bersifat non-toksik dan termasuk pelarut polaritas tinggi sehingga etanol mudah

larut di dalam air. Etanol juga dikenal sebagai pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non-polar hingga polar sehingga tujuan dari maserasi menggunakan pelarut etanol adalah untuk menarik semua komponen senyawa fitokimia dari tumbuhan obat (Dianda dan Suharti, 2022).

E. Uji Fitokimia Kualitatif dan Kuantitatif Senyawa Aktif

Uji fitokimia adalah uji untuk identifikasi golongan senyawa kimia yang terdapat dalam suatu simplisia tumbuhan. Uji fitokimia juga dapat digunakan untuk membuktikan ada tidaknya senyawa kimia tertentu di tumbuhan untuk dapat dikaitkan dengan aktivitas biologinya sehingga bisa membantu langkah-langkah fitofarmakologi dari tumbuhan tersebut. Uji fitokimia dilakukan dengan tahap uji kualitatif dan uji kuantitatif untuk menentukan kadar senyawa dari tanaman herbal (Ikalinus dkk., 2015).

Uji fitokimia kualitatif meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji triterpenoid/steroid, dan uji fenolik. Uji alkaloid dilakukan dengan pereaksi Wagner dan Meyer, uji flavonoid dilakukan dengan NaOH 10%, uji tanin dilakukan dengan pereaksi FeCl_3 , uji saponin dilakukan dengan HCl, dan uji terpenoid dilakukan dengan FeCl_3 1%. Hasil positif pada uji alkaloid adalah terbentuknya endapan putih pada pereaksi Meyer dan endapan coklat pada pereaksi Wagner, hasil positif pada uji flavonoid adalah terbentuknya warna merah muda atau merah, pada hasil positif pada uji tanin adalah terbentuknya perubahan warna menjadi hijau-kebiruan, hasil positif pada uji saponin adalah akan terbentuk busa, dan hasil positif pada uji terpenoid adalah terbentuknya

perubahan warna menjadi merah atau ungu, (Rahmawati dkk., 2023). Uji fenolik dilakukan dengan *reagen* FeCl_3 1% dengan hasil positifnya adalah terbentuk warna hijau-biru (Supriningrum dkk., 2020).

Uji fitokimia kuantitatif yang digunakan untuk menguji senyawa antioksidan adalah uji flavonoid dan uji fenolik. Analisis kuantitatif senyawa flavonoid total biasa dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis untuk dapat diketahuinya seberapa besar kadar flavonoid total yang terkandung dalam ekstrak yang ingin diuji. Analisis flavonoid sering dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis karena senyawa flavonoid sendiri memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi sehingga dapat memberikan pita serapan kuat di daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Aminah dkk., 2017). Analisis fenolik umumnya dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis karena gugus hidroksil dari komponen fenolik jika ditambahkan reagen *Folin-Ciocalteu* akan menghasilkan warna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV-Vis (Supriningrum dkk., 2020).

Penelitian uji fitokimia kualitatif yang telah dilakukan oleh Mbodj dkk., (2024) menunjukkan bahwa ekstrak daun kayu putih dengan pelarut polar seperti metanol dan air mengandung senyawa aktif berupa polifenol, flavonoid, tanin, dan alkaloid, sedangkan penggunaan pelarut semi-polar seperti etanol-air (hidroetanol) menghasilkan ekstrak yang tidak hanya mengandung senyawa tersebut, tetapi juga saponin. Penelitian uji fitokimia kuantitatif yang telah dilakukan oleh Wardhani dkk., (2018) dengan ekstrak etanol 70% daun galem (*Melaleuca cajuputi* Roxb.) memperoleh kadar flavonoid total sebesar 0,3438

mg QE/g ekstrak serta kadar fenolik total sebesar 16,5254 mg GAE/g ekstrak sedangkan penelitian yang dilakukan oleh dkk., (2021) dengan ekstrak etanol daun *Tea Tree (Melaleuca bracteata)* memperoleh kadar flavonoid total sebesar 21,6 mg QE/g ekstrak serta kadar fenolik total mencapai 98,7 mg GAE/g ekstrak.

F. Uji Antioksidan dengan Metode DPPH

Aktivitas antioksidan adalah aktivitas yang dihasilkan oleh bahan atau senyawa dari tanaman herbal yang dapat digunakan untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat menghasilkan radikal bebas. Pengujian aktivitas antioksidan biasa dilakukan dengan beberapa metode, seperti metode DPPH dengan 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, ABTS dengan 2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, dan *Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)* (Sagita dkk., 2022).

Metode DPPH adalah metode yang paling umum dipilih untuk uji aktivitas antioksidan, dengan prinsip dari metode DPPH adalah menangkap radikal bebas. DPPH adalah radikal bebas sintetik yang dapat larut dalam senyawa polar dan semipolar, seperti metanol dan etanol. DPPH yang bersifat radikal akan bereaksi dengan senyawa antioksidan dengan cara mengambil atom hidrogen untuk menetralkan elektronnya. Mekanisme tersebut disebut dengan donor atom hidrogen dan elektron (Nugraheni dkk., 2024).

Metode DPPH sering digunakan sebagai pengujian antioksidan karena proses pengukurannya cepat, sederhana, dan juga lebih murah dibandingkan

metode uji aktivitas antioksidan lainnya. Namun metode ini memiliki kelemahan yaitu radikal DPPH sendiri hanya dapat larut dalam pelarut organik dan harus selalu dibuat baru karena sensitif dengan keadaan lingkungan (Nugraheni dkk., 2024). Radikal DPPH digunakan untuk pengujian antioksidan karena memiliki elektron yang tidak berpasangan sehingga lebih stabil dan bersifat reaktif sehingga radikal DPPH cocok dengan senyawa polifenol yang memiliki gugus hidroksil. Semakin tinggi kandungan senyawa polifenol pada tanaman herbal, maka semakin banyak elektron yang disumbangkan ke radikal DPPH dan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Aryanti dkk., 2021).

Aktivitas antioksidan pada sampel dapat dihitung dengan nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*), yang adalah konsentrasi larutan sampel yang diperlukan untuk bantu menghambat 50% dari radikal bebas DPPH (Septian dkk., 2022). Semakin tinggi aktivitas antioksidan maka semakin rendah nilai IC_{50} yang didapati. Kekuatan antioksidan sendiri dapat dikategorikan berdasarkan nilai IC_{50} , antara lain sangat aktif dengan nilai < 50 ppm, aktif dengan nilai 50-100 ppm, sedang dengan nilai 101-250 ppm, lemah dengan nilai 251-500 ppm, dan tidak aktif dengan nilai > 500 ppm (Sulistyani dkk., 2024). Perbedaan nilai IC_{50} pada sampel dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, antara lainnya seperti cara penyimpanan, umur tanam, kandungan air, dan suhu (Septian dkk., 2022).

Penelitian uji aktivitas antioksidan yang telah dilakukan oleh Silva dkk., (2020) menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% bunga kayu putih memiliki aktivitas antioksidan dalam kategori sedang dengan

nilai IC_{50} sebesar 200 $\mu\text{g/mL}$. Sementara itu, hasil penelitian Surh dan Yun (2012) terhadap ekstrak butanol gabungan batang dan daun tanaman kayu putih menunjukkan aktivitas antioksidan yang jauh lebih tinggi, masuk dalam kategori sangat kuat, dengan nilai IC_{50} sebesar 4,8 $\mu\text{g/mL}$.

G. Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun kayu putih mengandung senyawa aktif flavonoid, steroid, tanin, alkaloid, dan fenolik.
2. Konsentrasi flavonoid dalam ekstrak daun kayu putih dengan pelarut etanol 70% berkisaran 5-25 mgQE/g ekstrak sedangkan konsentrasi fenolik di ekstrak etanol daun kayu putih berkisaran 25-100 mgEAG/g ekstrak.
3. Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun kayu putih tergolong kuat, dengan nilai yaitu 15-100 $\mu\text{g/mL}$.