

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Deskripsi Asem Pajang

Asem pajang merupakan tumbuhan asli Kalimantan, yaitu Sarawak, Sabah, Brunei dan Kalimantan. Asem pajang memiliki daerah penyebaran liar yang kebanyakan ditemukan di sekitar Kapit, Ulu Dapoi, Long Silat (Sarawak); Sipitang, Sandakan, Beaufort (Sabah); Sangkulirang dan Kutai Barat (Kalimantan). Sebagian besar, tumbuhan asem pajang tumbuh dengan liar di hutan tropis yang lembab dan teduh atau dengan penanaman di halaman belakang pada desa-desa (T. K., 2012). Pohon asem pajang di Sabah, berbunga pada bulan April sampai bulan Mei dan berbuah antara bulan Juli dan bulan September. Sedangkan di Kalimantan Timur, pohon asem pajang berbuah pada bulan Desember sampai bulan Maret (Mojiol *et al.*, 2018). Asem pajang memiliki berbagai macam nama daerah, yaitu:

1. Sarawak (Malaysia): mawang (Iban), embang, buah pangin (Malay) (T. K., 2012).
2. Sabah (Malaysia): embang (Kayan, Malay), bambangan, embawang (T. K., 2012).
3. Brunei: membangan (Kedayan), bambangan (T. K., 2012).
4. Kalimantan (Indonesia): limum (Sangkulirang), asem pajang (Kutai), alim (Kenyah, Dayak), hambawang (Malay), pangin (Punam, Malinau), lampayang (Lun Daye, Mentarang), pangaeng (Merap, Malinau), alieng (Kenyah Uma'Lung) (T. K., 2012) dan asam payang (Dayak) (Mulyoutami *et al.*, 2009).

Asem pajang merupakan pohon abadi (Gambar 2.1) setinggi 15-50 m yang memiliki batang besar lurus berdiameter 30-70 cm, kulit batang berwarna abu-abu, halus atau pecah-pecah, cabang-cabang dan kanopi berbentuk seperti payung yang terangkat tinggi. Daun dewasa (Gambar 2.2 dan Gambar 2.3) asem pajang berbentuk lonjong *elliptic* atau lonjong *obovate* yang keras dengan panjang 17,5-45 cm dan lebar 7-15 cm. Pangkal daun

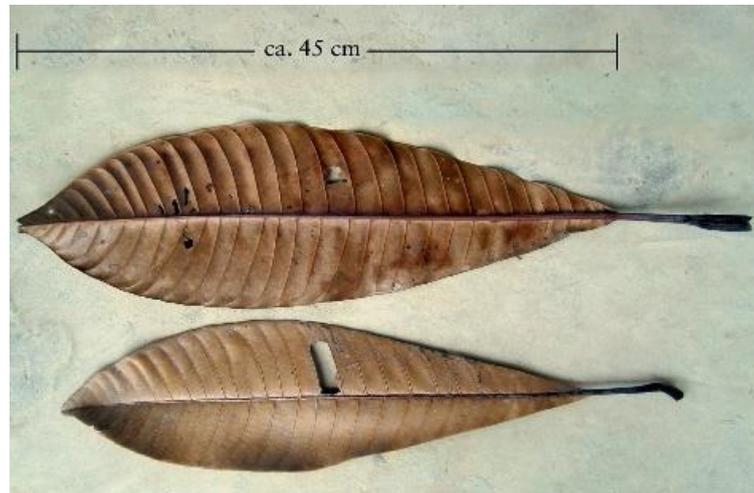
berbentuk *cuneate*, puncak daun berbentuk *acute* sampai *mucronate*, sedangkan tepi daun berbentuk *entire*. Daun asem pajang memiliki 14-30 pasang pertulangan daun yang menonjol, biasanya berwarna hijau tua dengan tangkai daun yang panjangnya hingga 12 cm. Tunas muda asem pajang berwarna perunggu sampai merah muda, *panicles* berada di pangkal dan juga di *axils* daun bagian atas yang berbentuk piramidal dengan panjang hingga 30 cm, memiliki cabang lateral dengan panjang hingga 1 cm dan berbunga padat. Bunga berwarna merah, berbentuk *ovate* atau lonjong *ovate* sepanjang 2 mm, daun pelindung pada bunga berbentuk segitiga, lobes berbentuk *ovate* dan kasar. Bunga memiliki 5 kelopak, berwarna merah keunguan pada permukaan bagian dalam dan berwarna putih kemerah-merahan pada bagian luar, berbentuk lonjong *elliptic* atau *lanceolate*. Bunga mempunyai 5-2 benang sari yang subur dan berfilamen dengan panjang 7 mm dan kepala sari berbentuk bulat telur lebar, *staminode* dengan panjang 5 mm. Asem pajang memiliki buah yang berbiji (Gambar 2.4 dan Gambar 2.5) berwarna kecoklatan, berbentuk bulat hingga bulat telur dengan lebar 15-20 cm, buah kasar dan dapat berbobot hingga 2-3 kg. Daging buah (Gambar 2.6) berwarna kuning, berserat dan dapat berasa asam sampai asam manis, agak harum (sedikit beraroma pisang) dengan kulit yang tebal, setebal 5-10 mm yang dapat menutupi satu batu besar (T. K., 2012).



Gambar 2.1 Pohon asem pajang di Tuaran Sabah, Malaysia, Kalimantan Utara (Mojiol *et al.*, 2018)



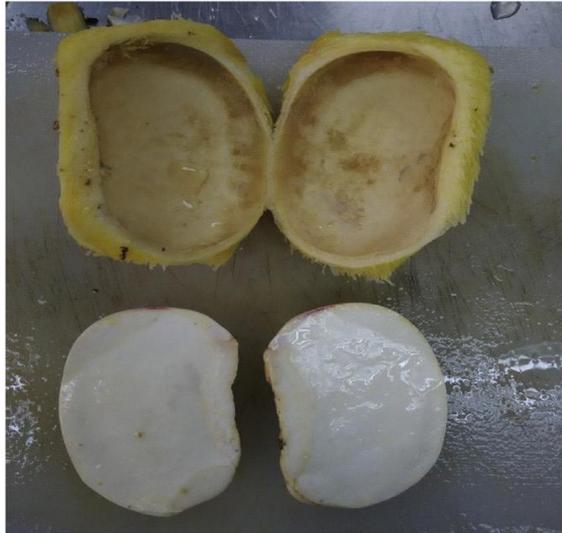
Gambar 2.2 Daun asem panjang (T. K., 2012)



Gambar 2.3 Daun kering asem panjang. Atas (bagian belakang daun) dan bawah (bagian depan daun) (Mojiol *et al.*, 2018)



Gambar 2.4 Buah asem panjang (Mojiol *et al.*, 2018)



Gambar 2.5 Biji asem pajang (Jahurul, Zaidul, *et al.*, 2018)



Gambar 2.6 Daging dan kulit buah asem pajang (T. K., 2012)

## 2.2 Taksonomi Asem Pajang

Berikut merupakan klasifikasi asem pajang menurut taksonominya, yaitu:

1. Ordo : *Sapindales*
2. Keluarga : *Anacardiaceae*
3. Genus : *Mangifera* L.
4. Sub genus : *Limus* (Marchand) Kostermans
5. Spesies : *Mangifera pajang* Kostermans
6. Nama umum : Bambang, Pajang

(Litz, 2009; T. K., 2012)

### 2.3 Pemanfaatan Asem Pajang

Asem pajang pada beberapa daerah sering dikonsumsi langsung atau diolah terlebih dahulu sebelum dimakan, di mana daging buah asem pajang dapat dimakan segar dan kulitnya dapat dimakan segar dengan sambal belacan atau diasinkan terlebih dahulu sebelum dimakan. Komunitas Kadazan-dusun di Sabah, membuat olahan asem pajang dengan sebutan “Nonsom Bambang” atau “Jeruk Bambang” (Gambar 2.7) dengan cara mengupas kulit dari buah asem pajang, lalu daging buah dipotong seukuran gigitan dan kemudian ditaburi dengan garam. Selanjutnya, biji dipotong terbuka lalu diparut dan dicampurkan dengan campuran buah dan garam. Setelah itu, olahan ini dibiarkan selama berminggu-minggu sebelum dimakan. Olahan ini diketahui dapat bertahan selama setahun, olahan ini umumnya dapat tersedia di semua pasar lokal. Sedangkan di Sarawak, buah asem pajang dimakan dengan sambal belacan atau dapat dimasak dalam kari, daun muda segar dijual di pasar lokal. Daun muda segar ini dapat dimasak dan dikonsumsi dengan sambal belacan atau tempoyak (T. K., 2012).



Gambar 2.7 Nonsom Bambang yang disimpan dalam wadah plastik (T. K., 2012)

### 2.4 Radikal Bebas

Radikal bebas adalah suatu atom, molekul atau ion yang pada orbit paling luar mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Elektron yang tidak berpasangan tersebut dilambangkan dengan titik superskrip ( $\bullet$ ) setelah simbol atom atau rumus kimia dari radikal bebas. Radikal bebas biasanya bersifat lebih reaktif dibandingkan dengan spesies induknya, hal

ini dikarenakan pasangan elektron pada orbital mewakili keadaan energi yang lebih rendah dibandingkan dengan elektron yang sama dan tidak berpasangan. Akan tetapi, reaktivitas kimiawi dari senyawa radikal bebas sangat bervariasi (Evans & Halliwell, 1999).

Terbentuknya radikal bebas dapat terjadi ketika radikal bebas tersebut menyumbangkan satu elektron, mengambil satu elektron dari molekul lain ataupun bergabung dengan molekul nonradikal yang lain. Hal ini mengakibatkan terjadinya reaksi berantai yang dapat menghasilkan radikal baru. Reaksi berantai yang terjadi akan terus berlanjut hingga radikal bebas itu berikatan dengan radikal bebas lainnya atau peredaman oleh sistem antioksidan dalam tubuh (Yuslianti, 2018). Tata nama spesies reaktif dari radikal bebas dapat dilihat pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Tata nama spesies reaktif

Radikal bebas	Non radikal bebas
<i>Reactive Oxygen Species (ROS):</i>	<i>Reactive Oxygen Species (ROS):</i>
Superoksida, $O_2^{\bullet-}$	Hidrogen peroksida, $H_2O_2$
Hidroksil, $OH^{\bullet}$	Asam hipobromus, $HOBr$
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Asam hipoklorus, $HOCl$
Karbonat, $CO_3^{\bullet-}$	Ozon, $O_3$
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet Oksigen, $O_2^1\Delta_g$
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Peroksida Organik, $ROOH$
Radikal karbon dioksida, $CO_2^{\bullet-}$	Peroksi Nitrit, $ONOO^-$
Singlet, $O_2^1\Sigma_g^+$	Peroksi Nitrat, $O_2NOO^-$
	Asam Peroksinitrat, $ONOOH$
	Peroksomono karbonat, $HOOCO_2^-$
<i>Reactive Chlorine Species (RCS):</i>	<i>Reactive Chlorine Species (RCS):</i>
Atom klorin, $Cl^{\bullet}$	Asam hipoklorus, $HOCl$
	Nitril klorida, $NO_2Cl$
	Kloramin
	Gas klorin, $Cl_2$
	Bromin klorida, $BrCl$
	Klorin dioksida, $ClO_2$
<i>Reactive Bromine Species (RBS):</i>	<i>Reactive Bromine Species (RBS):</i>
Atom bromin, $Br^{\bullet}$	Asam hipobromus, $HOBr$
	Gas Bromin, $Br_2$
	Bromin klorida, $BrCl$

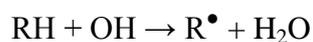
Radikal bebas	Non radikal bebas
<i>Reactive Nitrogen Species</i> (RNS):	<i>Reactive Nitrogen Species</i> (RNS):
Nitrat oksida, NO <sup>•</sup>	Asam Nitrat, HNO <sub>2</sub>
Nitrogen dioksida, NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Kation nitrosil, NO <sup>+</sup>
Radikal nitrat, NO <sub>3</sub> <sup>•</sup>	Anion nitrosil, NO <sup>-</sup>
	Dinitrogen tetraoksida, N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
	Dinitrogen trioksida, N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
	Peroksi nitrit, ONOO <sup>-</sup>
	Peroksi nitrat, O <sub>2</sub> NOO <sup>-</sup>
	Asam peroksinitrous, ONOOH
	Kation nitronium, NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	Alkil peroksinitrit, ROONO
	Alkil peroksinitrat, RO <sub>2</sub> ONO
	Nitril klorida, NO <sub>2</sub> Cl
	Peroksiasetil nitrat, CH <sub>3</sub> C(O)OONO <sub>2</sub>

(Halliwell, 2006)

Radikal bebas dapat berasal dari dalam tubuh (endogenus) dan dari luar tubuh (eksogenus). Sumber radikal bebas endogenus didapat melalui autooksidasi, oksidasi enzimatik, transpor elektron di dalam mitokondria, fagositosis pada respirasi, iskemik dan oksidasi ion-ion logam transisi. Sedangkan sumber radikal bebas eksogen didapat melalui radiasi, sinar UV, senyawa kimia klorotetraoksida, zat pewarna, asap rokok, senyawa hasil pemanggangan, dan lain sebagainya (Yuslianti, 2018). Adapun mekanisme reaksi pembentukan radikal bebas dibagi menjadi 3 tahapan reaksi, yaitu:

#### 2.4.1 Tahap inisiasi

Tahap inisiasi merupakan tahap pembentukan awal radikal bebas. Pada tahap ini, terjadi pemaksapisahan homolitik. Energi pada reaksi ini diberikan oleh sinar ultraviolet atau oleh pemanasan campuran pada suhu yang sangat tinggi. Contoh reaksi pada tahap ini adalah:

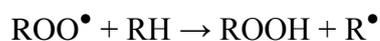
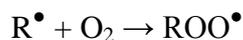


(Erlidawati *et al.*, 2018)

#### 2.4.2 Tahap propagasi

Tahap propagasi merupakan tahap reaksi yang melibatkan radikal bebas, di mana jumlah radikal bebas akan tetap sama. Dalam tahap ini, radikal bebas ROO<sup>•</sup> yang terbentuk akan mengikat atom hidrogen dari dalam molekul RH, sehingga menghasilkan ROOH dan radikal bebas R<sup>•</sup>. Hakikatnya, beberapa radikal bebas pada

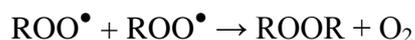
pembentukan awal akan mengakibatkan perkembangbiakan radikal bebas baru, yang biasa disebut dengan reaksi rantai. Contoh reaksi pada tahap ini adalah:



(Erlidawati *et al.*, 2018)

### 2.4.3 Tahap terminasi

Tahap terminasi merupakan tahap reaksi yang berujung dengan turunnya jumlah radikal bebas, hal ini disebabkan oleh penggabungan radikal bebas yang masih tersisa. Reaksi radikal bebas pada tahap ini adalah tahap terakhir yang bersifat stabil dan tidak reaktif. Contoh reaksi pada tahap ini adalah:



(Erlidawati *et al.*, 2018)

Proses fisiologis terbentuknya suatu radikal bebas di dalam tubuh disebut prooksidan, proses tersebut diimbangi dengan mekanisme pertahanan tubuh secara endogen yang merupakan agen anti radikal bebas atau disebut dengan antioksidan. Apabila prooksidan dan antioksidan seimbang, maka keadaan tubuh akan sehat, sedangkan apabila terganggunya keseimbangan tersebut dapat menyebabkan terjadinya stres oksidatif. Stres oksidatif ini dapat terjadi apabila timbulnya radikal bebas yang berlebih daripada antioksidan yang dihasilkan oleh mekanisme pertahanan tubuh. Stres oksidatif dapat menyebabkan gangguan fungsi biologi, seperti gangguan integrasi membran, homeostasis ion, aktivitas enzim, fungsi sel, hingga dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel (Yuslianti, 2018).

## 2.5 Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia merupakan senyawa yang memberikan elektron (*electron donors*). Sedangkan dalam pengertian biologis,

antioksidan adalah senyawa yang mampu meredam atau menangkal radikal bebas atau oksidan di dalam tubuh dengan cara mendonorkan satu elektronnya. Antioksidan secara umum terbagi menjadi antioksidan enzimatis dan antioksidan non-enzimatis. Contoh dari antioksidan enzimatis adalah enzim *catalase*, *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GSH-Px). Sedangkan antioksidan non-enzimatis terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu antioksidan yang larut dalam lemak (seperti flavonoid, karotenoid, quinon, tokoferol dan bilirubin) dan antioksidan yang larut dalam air (seperti asam urat, asam askorbat, protein pengikat heme dan protein pengikat logam) (Winarsi, 2007). Antioksidan berdasarkan mekanisme kerjanya digolongkan menjadi:

### **2.5.1 Antioksidan primer**

Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis atau antioksidan endogenus. McCord (1979), Aebi (1984) dan Urisini *et al.* (1995) menyebutkan bahwa yang termasuk antioksidan primer adalah enzim *catalase*, *superoxide dismutase* (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GSH-Px). Antioksidan primer adalah senyawa yang dapat memberikan atom hidrogennya dengan cepat kepada senyawa yang bersifat radikal, sehingga senyawa radikal tersebut berubah menjadi senyawa radikal yang lebih stabil. Enzim-enzim antioksidan tersebut dapat menghambat pembentukan dari radikal bebas, melalui pemutusan reaksi berantai (polimerisasi) yang selanjutnya mengubah senyawa radikal menjadi senyawa yang lebih stabil. Antioksidan primer ini dapat disebut juga dengan *chain-breaking-antioxidant* (Winarsi, 2007).

### **2.5.2 Antioksidan sekunder**

Antioksidan sekunder dapat disebut juga dengan antioksidan non-enzimatis atau antioksidan eksogenus atau sebagai sistem pertahanan preventif. Lampe (1999) menyebutkan bahwa antioksidan sekunder dapat berupa komponen nutrisi dan komponen non-nutrisi yang terkandung dalam buah-buahan maupun sayuran. Mekanisme kerja antioksidan sekunder dengan jalan memotong atau menangkap reaksi

oksidasi berantai yang disebabkan oleh radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut tidak dapat bereaksi dengan komponen seluler (Winarsi, 2007). Antioksidan sekunder dapat berupa vitamin E, vitamin C,  $\beta$ -karoten, isoflavon, asam urat, bilirubin, albumin dan sebagainya, di mana senyawa-senyawa tersebut dapat disebut dengan *scavenging free radical* atau penangkap radikal bebas (Erlidawati *et al.*, 2018).

### **2.5.3 Antioksidan tersier**

Menurut Demple dan Harrison (1994) dan Friedberg *et al.* (1995) antioksidan tersier meliputi metionin sulfoksida reduktase dan enzim DNA-*repair*. Enzim-enzim tersebut, berperan dalam perbaikan biomolekuler yang telah rusak akibat dari reaktivitas radikal bebas. Kerusakan DNA karena senyawa radikal bebas, dapat dilihat dengan rusaknya *single* dan *double strand* serta gugus basa maupun gugus non-basa (Winarsi, 2007).

## **2.6 Penggolongan Antioksidan Eksogenus**

Antioksidan eksogenus dapat terbagi menjadi 2 kelompok, yaitu antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia (antioksidan sintetis) dan antioksidan yang dihasilkan dari ekstraksi bahan alam (antioksidan alami), di mana:

### **2.6.1 Antioksidan sintetis**

Antioksidan sintetis merupakan antioksidan yang didapatkan dari hasil reaksi kimia dan telah diproduksi untuk tujuan komersial. Antioksidan sintetis yang penggunaannya telah diizinkan dan sering digunakan untuk makanan adalah *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanisole* (BHA), *tertiary butylhydroquinone* (TBHQ) dan tokoferol. Antioksidan-antioksidan sintetis tersebut termasuk antioksidan alami yang telah diproses secara sintetis untuk tujuan komersial. Tetapi, penggunaannya dibatasi oleh aturan pemerintah. Karena, apabila penggunaannya melebihi batas aturan,

dapat mengakibatkan adanya racun di dalam tubuh dan dapat bersifat karsinogenik (Erlidawati *et al.*, 2018).

## **2.6.2 Antioksidan alami**

Menurut Kumalaningsih (2006) Antioksidan alami merupakan antioksidan yang banyak berasal dari tumbuhan, senyawa antioksidan ini tersebar di beberapa bagian tumbuhan, seperti biji, akar, batang, daun, bunga, buah dan kulit. Antioksidan ini berguna sebagai reduktor, penangkal radikal bebas, pengkelat logam dan penekan oksigen singlet. Golongan senyawa yang termasuk antioksidan alami adalah senyawa turunan fenolat (seperti senyawa flavonoid), turunan senyawa hidroksinat, kumarin, tokoferol dan asam yang bermartabat banyak (Erlidawati *et al.*, 2018). Menurut Rice-Evens (1996) Aktivitas antioksidan suatu tumbuhan dapat dikaitkan dengan berbagai senyawa fitokimia yang ada pada tumbuhan tersebut (biasanya metabolit sekunder). Senyawa antioksidan alami yang terdapat pada tumbuhan dapat berupa senyawa fenolik (flavonoid, asam fenolik dan alkohol, stilbena, tokoferol serta tokotrienol), asam askorbat dan karotenoid. Kelompok senyawa utama yang bertindak sebagai penangkal radikal bebas atau antioksidan primer adalah flavonoid, tanin dan senyawa fenolik. Bahkan, beberapa senyawa fenolik alami ini aktivitas antioksidannya lebih baik dibandingkan dengan antioksidan sintetik (Dubey, 2014). Adapun senyawa antioksidan eksogen yang paling penting adalah senyawa fenolik, karotenoid dan vitamin C (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019), di mana:

**2.6.2.1 Senyawa fenolik.** Senyawa ini adalah senyawa yang termasuk komponen penting dalam mekanisme pertahanan dan persinyalan tanaman, di mana senyawa fenolik dapat memerangi stres yang disebabkan oleh organisme dan predator patogen. Senyawa fenolik dapat bertindak sebagai pendonor hidrogen dan mengkelat ion logam (seperti besi dan tembaga) dengan menghambat oksidasi dari *low-density lipoproteins* (LDL). Menurut Foti (2007) senyawa

fenolik dapat mengurangi atau menghambat radikal bebas dengan cara mentransfer atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Mekanisme reaksi antara senyawa fenolik dengan radikal peroksil ( $\text{ROO}^\bullet$ ) melibatkan transfer kation hidrogen dari senyawa fenol ke senyawa radikal, sehingga dapat membentuk keadaan transisi ikatan H-O dengan satu elektron. Kapasitas antioksidan senyawa fenolik dapat sangat berkurang jika pelarutnya rentan terhadap pembentukan ikatan hidrogen ketika berikatan dengan senyawa fenolik. Misalnya, alkohol mempunyai efek ganda terhadap laju reaksi antara fenol dan radikal peroksil, di mana alkohol dapat bertindak sebagai akseptor ikatan hidrogen. Selain itu, alkohol dapat mengubah ionisasi fenol menjadi fenionida anion yang dapat bereaksi secara cepat dengan radikal peroksil melalui transfer elektronnya. Dengan demikian, tingkat ionisasi senyawa terakhir sangat mempengaruhi efek keseluruhan pelarut pada aktivitas antioksidan senyawa fenolik (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

**2.6.2.2 Karotenoid.** Senyawa ini dapat memberikan pigmentasi pada sistem biologis dan dapat memenuhi fungsi penting lainnya, di mana studi terbaru menunjukkan bahwa senyawa karotenoid fungsinya difokuskan sebagai antioksidan. Fragmen dasar struktural senyawa karotenoid adalah rantai ganda tak jenuh terkonjugasi, di mana fragmen inilah yang terutama bertanggung jawab dengan kemampuan senyawa karotenoid untuk menghambat radikal bebas. Karotenoid bertindak sebagai agen antioksidan melalui beberapa mekanisme, yaitu melalui *single electron transfer* (SET), melalui pembentukan *one adduct* dan melalui *hydrogen atom transfer* (HAT). Sifat antioksidan dari senyawa karotenoid tergantung dengan kapasitas tinggi elektron yang disumbangkannya (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

**2.6.2.3 Vitamin C.** Frei *et al.* (1989) menyatakan bahwa vitamin C merujuk kepada sekelompok analog asam askorbat yang berupa

molekul sintetik atau alami. Asam askorbat merupakan agen pereduksi kuat dan dapat mengalami dua kehilangan elektron berikutnya untuk membentuk radikal askorbat dan asam dehidroaskorbat. Dalam plasma manusia sehat konsentrasi askorbat sekitar 10 µg/ml, di mana pada konsentrasi tersebut askorbat dapat bertindak sebagai co-antioksidan dengan vitamin E dalam melindungi LDL dari radikal peroksil. Menurut Abraham (2014) dan Lee *et al.* (2004) vitamin C atau asam askorbat dapat bertindak sebagai antioksidan yang larut dalam air, di mana mekanisme antioksidan vitamin C didasarkan pada HAT terhadap radikal peroksil, inaktivasi oksigen singlet dan eliminasi oksigen molekuler (Francenia Santos-Sánchez *et al.*, 2019).

## 2.7 Pemisahan Senyawa

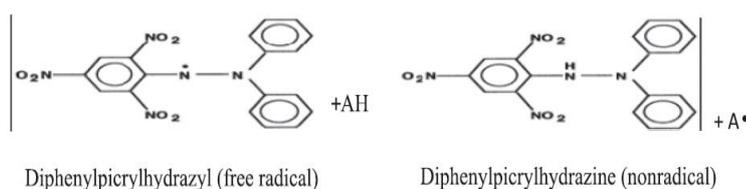
Sebelum dilakukan proses pemisahan senyawa, maka suatu sampel (misalnya tanaman) biasanya diserbukkan terlebih dahulu dari simplisia. Simplisia merupakan bahan alamiah yang digunakan sebagai obat dan belum mengalami pengolahan apapun. Jika tidak dinyatakan ataupun disebutkan lain, simplisia adalah bahan yang telah dikeringkan (Anonim, 1985). Pemisahan senyawa atau isolasi merupakan proses keseluruhan pengambilan suatu senyawa tertentu dalam keadaan yang murni dari sampel. Tahapan-tahapan yang melibatkan isolasi adalah ekstraksi, fraksinasi dan pemurnian senyawa aktif, di mana isolasi ini bertujuan untuk mencari senyawa bioaktif dan mendapatkan senyawa dalam keadaan murni dari suatu sampel (Haryoto & Priyatno, 2018). Tahapan pertama dari isolasi adalah ekstraksi, di mana ekstraksi adalah salah satu teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu maupun lebih senyawa (analit) atau komponen yang terkandung dalam sampel menggunakan pelarut tertentu dan sesuai (Leba, 2017). Hasil dari proses ekstraksi disebut dengan ekstrak, di dalam ekstrak terkandung puluhan sampai ratusan senyawa organik tergantung karakteristik dari sampel (Haryoto & Priyatno, 2018).

Tahapan isolasi setelah proses ekstraksi adalah fraksinasi, di mana fraksinasi merupakan proses memisahkan suatu senyawa berdasarkan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan, sehingga senyawa dapat dipisahkan berdasarkan tingkat kepolarannya (Marpaung, 2020). Adapun teknik yang biasa digunakan dalam proses fraksinasi adalah teknik kromatografi. Setelah dilakukan fraksinasi dan didapatkan fraksi, tahapan akhir dari proses isolasi adalah pemurnian senyawa aktif. Apabila fraksi mengandung satu atau lebih senyawa maupun pengotor, maka dilakukan pemurnian dengan teknik kromatografi. Tahapan ini dapat dilakukan secara berulang (mengggunakan variasi pelarut) hingga didapatkan senyawa yang murni (Haryoto & Priyatno, 2018).

## 2.8 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

### 2.8.1 Metode invitro

**2.8.1.1 Metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).** Molekul DPPH dikarakteristikan sebagai radikal bebas yang bersifat stabil berdasarkan delokalisasi elektron cadangan atas molekul secara keseluruhan. Delokalisasi elektron ini dapat menyebabkan timbulnya warna ungu tua pada larutan dengan pita serapan dalam larutan etanol yang berpusat pada panjang gelombang sekitar 517 nm. Apabila larutan DPPH dicampurkan dengan substrat (AH) yang menyumbangkan atom hidrogennya (Gambar 2.8), maka akan menimbulkan bentuk yang tereduksi dengan kehilangan warna ungu. Pengujian potensi aktivitas antioksidan dapat dilakukan melalui penangkapan radikal bebas oleh sampel uji dengan memonitor perubahan kepadatan optik radikal DPPH (Alam *et al.*, 2013).



Gambar 2.8 Mekanisme reaksi DPPH (Alam *et al.*, 2013)

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dapat mengikuti metode yang dilakukan oleh Manzocco *et al.* (1998), di mana 0,2 ml sampel diencerkan dengan metanol dan ditambahkan 2 ml larutan DPPH (0,5 mM). Lalu, didiamkan selama 30 menit dan ukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Persentase penghambatan radikal DPPH dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan radikal DPPH (\%)} = \frac{A_{br} - A_{ar}}{A_{br}} \times 100$$

Keterangan:

$A_{br}$  : Absorbansi sebelum reaksi

$A_{ar}$  : Absorbansi setelah reaksi

(Alam *et al.*, 2013)

**2.8.1.2 Metode hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).** Manusia dapat terpapar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> secara tidak langsung dari lingkungannya hampir sekitar 0,28 mg/kg/hari. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dapat masuk ke dalam tubuh dengan cara penghirupan kabut atau uap dan juga dapat melalui kontak mata atau kulit. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dapat dengan cepat terurai menjadi oksigen dan air, sehingga dapat menghasilkan radikal hidroksil (OH). Hal tersebut dapat memulai terjadinya peroksidasi lipid dan dapat menyebabkan kerusakan DNA di dalam tubuh. Pengujian aktivitas antioksidan dengan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dapat mengikuti metode dari Ruch *et al.* (1989), di mana 20-60 µg/ml sampel dalam air suling ditambahkan ke dalam larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 mM (yang telah dibuat dalam buffer fosfat (50 mM) pada pH 7,4) dan absorbansinya dibaca pada panjang gelombang 230 nm yang ditentukan setelah didiamkan selama 10 menit terhadap blanko (buffer fosfat). Persentase penangkapan radikal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penangkapan radikal H}_2\text{O}_2 (\%) = \frac{A_i - A_t}{A_i} \times 100$$

Keterangan:

$A_i$  : Absorbansi larutan kontrol

$A_t$  : Absorbansi larutan uji

(Alam *et al.*, 2013)

**2.8.1.3 Metode *nitric oxide* ( $\text{NO}^\bullet$ ).** Menurut Marcocci *et al.* (1994)  $\text{NO}^\bullet$  dapat dihasilkan dari senyawa natrium nitroprusida yang terurai dalam larutan berair pada pH fisiologis (pH 7,2).  $\text{NO}^\bullet$  dapat bereaksi dengan oksigen untuk menghasilkan produk stabil yaitu nitrat dan nitrit dalam kondisi aerobik, di mana jumlahnya dapat ditentukan menggunakan pereaksi Griess. Metode pengujiannya dapat dilakukan dengan cara melarutkan 2 ml natrium nitroprusida (10 mM) ke dalam 0,5 ml fosfat buffer saline (pH 7,4). Lalu campuran tersebut ditambahkan dengan 0,5 ml sampel berbagai konsentrasi (0,2-0,8 mg/ml). Setelah itu, campuran tersebut diinkubasi selama 150 menit pada suhu 25 °C. Selanjutnya larutan inkubasi diambil sebanyak 0,5 ml dan ditambahkan dengan 0,5 ml reagen Griess. Reagen Griess berisi 1 ml pereaksi asam sulfanilat (0,33% dalam asam asetat glasial 20% selama 5 menit pada suhu kamar dengan neftiletildiamin diklorida (0,1% b/v)). Setelah itu, campuran larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, di mana absorbansinya diukur pada panjang gelombang 546 nm. Persentase penghambatan radikal  $\text{NO}^\bullet$  dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan radikal } \text{NO}^\bullet (\%) = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

Keterangan:

$A_0$  : Absorbansi sebelum reaksi

$A_1$  : Absorbansi setelah reaksi

(Alam *et al.*, 2013)

**2.8.1.4 Metode radikal *peroxynitrite* ( $\text{ONOO}^\bullet$ ).** *Peroxynitrit* ( $\text{ONOO}^\bullet$ ) merupakan sitotoksikan yang memiliki sifat sebagai pengoksidasi kuat terhadap berbagai komponen seluler, seperti lipid, sulfhidril,

nukleotida dan asam amino. Selain itu  $\text{ONOO}^\bullet$  dapat menyebabkan peroksidasi lipid, penuaan, karsinogenesis dan kematian sel.  $\text{ONOO}^\bullet$  merupakan spesies reaktif yang relatif stabil dibandingkan dengan radikal bebas lainnya, namun apabila  $\text{ONOO}^\bullet$  sekali diprotonisasi akan menghasilkan asam peroksinitrat ( $\text{ONOOH}$ ) yang bersifat sangat reaktif. Senyawa  $\text{ONOOH}$  dapat terurai dalam waktu paruh yang sangat singkat, yaitu 1,9 detik pada suhu  $37^\circ\text{C}$  untuk membentuk berbagai macam sitotoksikan, selain itu, senyawa ini juga dapat menginduksi oksidasi dari kelompok thiol ( $-\text{SH}$ ) pada protein, peroksidasi lipid, nitrosasi tirosin dan reaksi nitrosasi. Hal tersebut dapat mempengaruhi transduksi sinyal dan metabolisme sel. Pada akhirnya dapat menyebabkan cedera seluler dan jaringan yang ditandai dengan kerusakan untai DNA dan kematian sel apoptosis. Pembentukan senyawa yang berlebih dapat berkontribusi untuk menimbulkan beberapa penyakit pada manusia, seperti aterosklerosis, rheumatoid arthritis, alzheimer dan kanker. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode ini dapat mengikuti metode dari Kooy *et al.* (1994), di mana metode tersebut melibatkan larutan stok dihidroksirhodamin 123 (DHR 123) 5 mM dalam dimetilformamida yang dibersihkan dengan nitrogen dan disimpan pada suhu  $-80^\circ\text{C}$ . Larutan dengan DHR 123 (konsentrasi akhir 5  $\mu\text{M}$ ) diencerkan dari larutan stok dan ditempatkan di tempat yang gelap di atas es segera sebelum digunakan. Sedangkan larutan natrium fosfat 50 mM (pH 7,4) sebagai larutan penyangga yang mengandung natrium klorida 90 mM dan kalium klorida 5 mM dengan asam dietilentriaminpentaasetat (DTPA) 100  $\mu\text{M}$  yang telah dibersihkan dengan nitrogen dan ditempatkan di atas es sebelum digunakan. Aktivitas penangkapan radikal bebas pada metode ini diukur menggunakan spektrofotometer fluoresensi lempeng mikro dengan eksitasi dan panjang gelombang emisi masing-masing adalah 485 nm dan 530 nm pada suhu kamar. Intensitas fluoresensi akhir diukur setiap 5 menit setelah perlakuan tanpa 3-morfolino-

sidnonimina (SIN-1) atau asli (ONOO<sup>•</sup>). Oksidasi DHR 123 dengan dekomposisi SIN-1 meningkat secara bertahap, sedangkan ONOO<sup>•</sup> asli dapat dengan cepat mengoksidasi DHR 123 dengan intensitas fluoresensi akhir dari waktu ke waktu stabil (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.5 Metode trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)/2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS).** Metode TEAC/ABTS ini merupakan metode yang menggunakan spektrofotometer *diode-array* untuk mengukur kehilangan warna larutan ketika antioksidan ditambahkan ke dalam kromofor biru-hijau ABTS<sup>•+</sup>. Pada reaksi tersebut antioksidan pengurangan ABTS<sup>•+</sup> menjadi ABTS dengan menghilangkan warna pada larutan. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ini dapat mengikuti metode dari Seeram *et al.* (2006), di mana kation radikal ABTS dibuat dengan mencampurkan 80 mg mangan dioksida padat ke dalam larutan stok ABTS 5 mM (20 ml menggunakan buffer Na/K 75 mM pada pH 7). Trolox (Analog vitamin E yang larut dalam air) dapat digunakan sebagai standar, di mana kurva kalibrasi Trolox dibuat pada berbagai konsentrasi, yaitu 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 dan 300  $\mu$ M. Sedangkan sampel diencerkan dengan tepat dalam buffer Na/K (pH 7). Setelah sampel diencerkan, sampel dicampur dengan 200  $\mu$ l larutan kation radikal ABTS<sup>•+</sup> di dalam plate 96-well dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 750 nm setelah 5 menit dalam pembaca mikroplate. Kurva standar Trolox dapat digunakan untuk menghitung nilai TEAC dan dinyatakan sebagai setara Trolox dalam mM (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.6 Metode total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP).** Metode TRAP ini didasarkan oleh perlindungan antioksidan pada peluruhan fluoresensi R-pikoeitritin (R-PE) selama reaksi peroksidasi yang terkontrol. Fluoresensi tersebut didinginkan oleh generator radikal atau yang disebut dengan 2,2'-azo-bis-(2-amidino-

propana)hidroklorida) (ABAP), di mana pengukuran aktivitas antioksidannya didapat melalui peluruhan dalam dekolorisasi. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Ghiselli *et al.* (1995), di mana 120 µl sampel encer ditambahkan ke dalam 2,4 ml larutan dapar fosfat (pH 7,4); 375 µl air bidistillata; 30 µl R-PE encer dan 75 µl ABAP. Kinetika reaksi campuran tersebut diukur menggunakan spektrometer luminesensi selama 45 menit pada suhu 38 °C. Nilai TRAP dihitung melalui perbandingan sampel dengan standar dari panjang fase lag (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.7 Metode *ferric reducing-antioxidant power* (FRAP).** Metode FRAP dapat mengukur aktivitas antioksidan untuk mereduksi zat besi, hal ini didasarkan pada prinsip kerjanya dengan mengurangi kompleks besi dan 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniasiklopenta-1,4-diena klorida (TPTZ) ke dalam bentuk besi pada kondisi pH yang rendah. Pengurangan ini diamati dengan cara mengukur perubahan penyerapan pada panjang gelombang 593 nm menggunakan spektrofotometer *dioda-array*. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Benzie dan Strain (1999), di mana campuran 3 µl reagen FRAP dengan 100 µl sampel yang sudah diencerkan. Setelah itu, inkubasi larutan selama 30 menit pada suhu 37 °C dan absorbansi diamati pada panjang gelombang 593 nm. Nilai FRAP diperoleh dari peningkatan konsentrasi  $Fe^{3+}$  dan dinyatakan dalam mM dari ekuivalensi  $Fe^{2+}$  per kg sampel (makanan padat) atau per L sampel (minuman) (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.8 Metode radikal *superoxide* (SOD).** Metode SOD dapat digunakan untuk mengukur penangkapan radikal suatu sampel yang dapat mengikuti metode dari Robak dan Gryglewski (1988), di mana radikal anion SOD dihasilkan dari 3,0 ml buffer Tris-HCL 16 mM (pH 8) yang mengandung 0,5 ml nitrobiru tetrazolium (NBT) 0,3 mM; 0,5 ml larutan NADH 0,936 mM; 1 ml sampel dan 0,5 ml

buffer Tris-HCl 16 mM (pH 8). Campuran larutan tersebut ditambahkan dengan 0,5 ml fenazin metosulfat (PMS) 0,12 mM, lalu diinkubasi selama 5 menit pada suhu 25 °C dan selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 560 nm (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.9 Metode radikal *hidroxyl*.** Radikal ini merupakan salah satu spesies oksigen reaktif yang bersifat kuat dalam sistem biologis. Radikal ini dapat bereaksi dengan gugus asam lemak tak jenuh ganda dari membran sel fosfolipid, sehingga dapat menyebabkan kerusakan sel. Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode ini dapat mengikuti prinsip metode yang dilakukan oleh Kunchancy dan Rao (1990), di mana menambahkan 1 ml asam triobatbiturat (1%) dan 1 ml asam trikloroasetat (2,8%) ke dalam 1 ml campuran reaksi. Campuran reaksi terdiri dari 100 µl 2-dioksi-dribosa 28 mM (dalam buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH 20 mM (pH 7,4)), 500 µl sampel, 200 µl EDTA 1,04 mM dan 200 µM FeCl<sub>3</sub> (1 : 1 v/v), 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM dan 100 µl asam askorbat 1 mM yang telah diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, inkubasi selama 20 menit pada suhu 100 °C dan setelah didinginkan, absorbansinya diukur pada panjang gelombang 532 nm (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.10 Metode *hidroxyl radical averting capacity (HORAC)*.** Pengujian aktivitas antioksidan dapat mengikuti metode yang dilakukan oleh Ou *et al.* (2002), di mana metode ini dapat mengukur aktivitas chelating logam dari antioksidan dalam kondisi reaksi mirip dengan Fenton yang menggunakan kompleks Co (II), sehingga dapat melindungi terhadap pembentukan radikal hidroksil. Larutan hidrogen peroksida 0,55 M dibuat dalam air suling dan Co (II) 4,6 mM (dibuat dengan melarutkan 15,7 mg CoF<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O dan 20 mg asam pikolinat dalam air suling). Fluorescein-170 µl (60 nM, konsentrasi akhir) dan 10 µl sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 37 °C. Setelah proses inkubasi, tambahkan 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (27,5 mM, konsentrasi akhir) dan 10 µl larutan Co (II) (230 µM,

Konsentrasi akhir). Setelah pembacaan dilakukan setiap menitnya, fluoresensi awal diukur. Nilai akhir HORAC dapat dihitung dengan persamaan regresi antara konsentrasi antioksidan standar dengan luas area bersih di bawah kurva (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.11 Metode *oxigen radical absorbance capacity* (ORAC).** Metode ORAC merupakan metode analisis tabung reaksi baru yang menarik dan revolusioner untuk menguji aktivitas antioksidan suatu sampel. Pengujian menggunakan metode ORAC dilakukan menggunakan standar Trolox (analog vitamin E yang larut dalam air) untuk menentukan *Trolox Equivalent* (TE). Nilai ORAC dihitung melalui TE dan dinyatakan sebagai nilai ORAC. Apabila nilai ORAC semakin tinggi, maka aktivitas antioksidan suatu sampel akan semakin besar. Pengujian dengan metode ini didasarkan pada generasi radikal bebas menggunakan 2,2-azobis(2-amidinoopropana)dihidroklorida (AAPH) dan pengukuran pada penurunan fluoresensi dari agen penangkap radikal bebas. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Prior *et al.* (2003) yang melakukan metode ini dalam plat fluoresensi polipropilena 96-well dengan volume akhir 200  $\mu$ l. Pengujian ini dilakukan dengan Trolox (6,25; 12,5; 25; 50  $\mu$ mol/L untuk pengujian lipofilik dan 12,5; 25; 50; 100  $\mu$ mol/L untuk pengujian hidrofilik) yang digunakan sebagai standar, sedangkan untuk larutan blankonya menggunakan buffer fosfat 75 mM/L. Setelah itu, tambahkan AAPH dan pelat diletakkan segera pada penghitung multilabel yang telah dipanaskan sebelumnya hingga 37 °C. Pelat dikocok selama 10 detik secara orbital dan fluoresensi dibaca setiap 1 menit selama 35 menit pada panjang gelombang eksitasi 485 nm dan panjang gelombang emisi 520 nm. Perhitungan area di bawah kurva dapat menggunakan perangkat lunak *Wallac Workout 1.5*. metode ini dinyatakan dalam  $\mu$ M dari TE per gram berat kering sampel ( $\mu$ M TE/g) (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.12 Metode *reducing power* (RP).** Metode RP merupakan metode yang didasarkan pada prinsip peningkatan absorbansi dari campuran reaksi, di mana peningkatan absorbansi menunjukkan peningkatan aktivitas antioksidan suatu sampel. Prinsipnya, senyawa antioksidan membentuk kompleks berwarna dengan kalium ferisianida, feri klorida dan asam trikloro asetat yang diukur pada panjang gelombang 700 nm. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Oyaizu (1986) dengan cara menambahkan 2,5 ml buffer fosfat 0,2 M (pH 6,6) dan 2,5 ml  $K_3Fe(CN)_6$  (1% b/v) ke dalam 1,0 ml sampel yang dilarutkan ke dalam air suling. Selanjutnya, campuran tersebut diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C dan ditambahkan dengan 2,5 ml asam asetat trikloro (10% b/v). Setelah itu, campuran disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm dan kumpulkan lapisan atas larutan sebanyak 2,5 ml. Lapisan atas tersebut dicampurkan dengan 2,5 ml air suling dan 0,5 ml  $FeCl_3$  (0,1% b/v), lalu absorbansi diukur pada panjang gelombang 700 nm (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.13 Metode *Phosphomolybdenum*.** Pengujian kapasitas antioksidan total merupakan metode spektroskopi untuk penentuan kapasitas antioksidan secara kuantitatif melalui pembentukan kompleks fosfomolibdenum. Pengujian ini didasarkan oleh analit sampel yang mereduksi Mo (VI) menjadi Mo (V) dan pembentukan kompleks Mo (V) fosfat hijau pada kondisi pH yang asam. Total kapasitas antioksidan dapat dihitung menggunakan metode dari Prieto *et al.* (1999), di mana mencampurkan 0,1 ml larutan sampel (100 µg) dengan 1 ml reagen (terdiri dari asam sulfat 0,6 M; natrium fosfat 28 mM dan amonium molibdat 4 mM). Kemudian tabung ditutup dan diinkubasi ke dalam bak air mendidih selama 90 menit pada suhu 95 °C. Setelah itu, dinginkan sampel hingga mencapai suhu kamar dan absorbansi larutan berair diukur pada panjang gelombang 695 nm menggunakan spektrofotometer UV.

Apabila komposisi sampel tidak diketahui, maka kapasitas antioksidan dapat dinyatakan setara dengan  $\alpha$ -tokoferol (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.14 Metode *ferric thiocyanate* (FTC).** Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode FTC ini dapat mengikuti metode dari Kikuzaki *et al.* (1991), di mana 4 mg sampel (konsentrasi akhir 0,02% b/v) dicampurkan ke dalam 4 ml etanol; 4,1 ml asam linoleat 2,51% dalam etanol; 8,0 ml buffer fosfat 0,02 M (pH 7,0) dan 3,9 ml air suling. Campuran tersebut dimasukkan ke dalam vial tutup ulir dan ditempatkan ke dalam oven pada suhu 40°C dalam keadaan gelap. Selanjutnya, ambil 0,1 ml campuran tersebut dan pindahkan ke dalam tabung reaksi, lalu tambahkan 9,7 ml etanol berair (75% v/v); 0,1 ml amonium tiosianat berair 30% dan 0,1 ml ferro klorida 0,02 M dalam asam hidroklorat 3,5%. Ketika 3 menit setelah penambahan ferro klorida ke dalam campuran tersebut, maka akan menghasilkan warna merah yang absorbansinya dapat diukur pada panjang gelombang 500 nm setiap 24 jam hingga absorbansi kontrol mencapai maksimum (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.15 Metode *thiobarbituric acid* (TBA).** Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode TBA ini dapat mengikuti metode dari Ottolenghi (1959), di mana 2 ml asam trikloroasetat 20% dan 2 ml asam tiobarbiturat 0,67% ditambahkan ke dalam 1 ml larutan sampel yang kemudian ditempatkan dalam penangas air mendidih selama 10 menit dan disentrifugasi setelah pendinginan selama 20 menit pada 3000 rpm. Absorbansi yang diukur adalah absorbansi dari supernatan pada panjang gelombang 552 nm, amati hingga mencapai panjang gelombang maksimum (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.16 Metode *N,N-dimethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride* (DMPD).** Metode DMPD ini telah dikembangkan sebagai pengukuran aktivitas antioksidan dalam sampel biologis dan sampel makanan. Metode DMPD didasarkan pada pengurangan larutan buffer dari DMPD yang berwarna dalam buffer asetat dan

besi klorida. Pengukuran pada metode ini melalui penurunan absorbansi DMPD oleh penangkap radikal bebas pada panjang gelombang maksimal 505 nm. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Fogliano *et al.* (1999) dengan cara mencampurkan 1 ml larutan DMPD 200 mM; 0,4 ml besi klorida (III) 0,05 M dan 100 ml larutan buffer natrium asetat 0,1 M dengan memodifikasi pH hingga menjadi 5,25. Campuran tersebut harus disimpan dalam keadaan gelap pada suhu rendah (4-5 °C) dan di bawah pendinginan. Reaksi akan terjadi ketika penambahan 50 µl sampel (pengenceran 1 : 10 dalam air) ke dalam 950 µl larutan DMPD<sup>•+</sup>. Selanjutnya, pengukuran absorbansi dilakukan setelah 10 menit pengadukan kontinu (waktu yang dibutuhkan untuk mencapai nilai dekolorisasi yang konstan). Hasil yang diperoleh dikuantifikasi dalam mM Trolox terhadap kurva kalibrasi yang relevan (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.17 Metode *β-carotene linoleic acid/conjugated diene*.** Metode ini merupakan salah satu metode yang cepat untuk menentukan antioksidan, di mana metode ini didasarkan pada prinsip yang menyatakan bahwa asam linoleat merupakan asam lemak tak jenuh dioksidasi oleh spesies oksigen reaktif yang diproduksi oleh air yang mengandung oksigen. Produk yang telah terbentuk akan mengoksidasi β-karoten, sehingga akan menyebabkan perubahan warna. Antioksidan suatu sampel diukur melalui tingkat pengurangan warna yang diukur pada panjang gelombang 434 nm. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Kabouche *et al.* (2007), di mana 0,5 mg β-karoten dalam 1 ml kloroform dicampurkan ke dalam 25 µl asam linoleat dan 200 mg campuran emulsi tween-80. Selanjutnya, kloroform yang telah diuapkan pada suhu 40 °C dan 100 ml air suling jenuh dengan oksigen secara perlahan ditambahkan ke dalam residu, lalu larutan diaduk dengan kuat agar dapat membentuk emulsi yang stabil. Ambil 4 ml campuran tersebut dan masukkan ke dalam

tabung reaksi yang telah berisi 200 µl sampel dalam metanol pada konsentrasi akhir (25, 50, 100, 200 dan 400 µg/ml). Absorbansi (waktu 0 menit) segera diukur setelah larutan emulsi dimasukkan ke dalam tabung pada panjang gelombang 470 nm. Kemudian tabung diinkubasi selama 2 jam pada suhu 50 °C. Standar yang digunakan pada metode ini adalah vitamin C. Persentase penghambatan pada metode ini dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan (\%)} = 1 - \frac{(As - As_{120})}{(Ac - Ac_{120})} \times 100$$

Keterangan:

As : Absorbansi sampel awal

As<sub>120</sub> : Absorbansi sampel pada 120 menit

Ac : Absorbansi kontrol negatif awal

Ac<sub>120</sub> : Absorbansi kontrol negatif pada 120 menit

(Alam *et al.*, 2013)

**2.8.1.18 Metode *xanthine oxidase*.** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Noro *et al.* (1983), di mana metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan 500 µl dari 0,1 mg/ml sampel, 100 µg/ml alupurinol dalam metanol, 1,3 ml dapar fosfat 0,05 M (pH 7,5) dan 0,2 ml dari 0,2 unit/ml larutan xantin oksidase. Selanjutnya, inkubasi larutan selama 10 menit pada suhu 25 °C, lalu tambahkan 1,5 ml larutan substrat xanthine 0,15 M. Kemudian, campuran larutan tersebut diinkubasi lagi selama 30 menit pada suhu 25 °C. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 293 nm. Persentase penghambatan pada metode ini dapat dihitung menggunakan persamaan sebagai berikut:

$$\text{Penghambatan (\%)} = 1 - \frac{As}{Ac} \times 100$$

Keterangan:

As : Absorbansi sampel

Ac : Absorbansi kontrol

(Alam *et al.*, 2013)

#### **2.8.1.19 Metode *cupric ion reducing antioxidant capacity* (CUPRAC).**

Metode CUPRAC memiliki reagen pengoksidasi kromagenik yang telah dikembangkan, yaitu bis(neokuproin) tembaga(II) klorida [Cu(II)-Nc] yang bereaksi dengan polifenol [Ar(OH)*n*]. Proton yang telah dibebaskan dapat disangga menggunakan larutan penyangga amonium asetat yang relatif terkonsentrasi. Pada reaksi tersebut, gugus polifenol Ar-OH reaktif dioksidasi menjadi kuinon yang sesuai serta Cu (II)-Nc yang direduksi menjadi Cu (I)-Nc *chelate* dengan intensitas warna yang tinggi pada panjang gelombang maksimum 450 nm. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Apak *et al.* (2008), di mana 1 ml CuCl<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> M; 1 ml 7,5 x 10<sup>-3</sup> neokuproin dan 1 M larutan NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO dicampurkan dan dimasukkan ke dalam gelas reaksi. Selanjutnya tambahkan 400 µl larutan standar yang baru disiapkan dan encerkan volume akhir larutan dengan air deionisasi hingga 4,1 ml. Ulangi prosedur tersebut untuk penambahan larutan sampel yang baru disiapkan pada konsentrasi 400 µl, 300 µl, 200 µl, 100 µl dan 50 µl. Setelah itu inkubasi pada suhu kamar selama 30 menit dan ukur absorbansinya menggunakan spektrometer pada panjang gelombang 450 nm (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.1.20 Metode *metal chelating*.** Pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Dinis *et al.* (1994), di mana 0,1 ml sampel dicampurkan ke dalam 0,5 ml larutan besi klorida 0,2 mM dan ditambahkan dengan 0,2 ml larutan ferozin 5 mM. Setelah penambahan larutan ferozin reaksi akan dimulai dan larutan diinkubasi selama 10 menit pada suhu kamar, lalu ukur absorbansi pada panjang gelombang 562 nm. EDTA atau asam sitrat dapat digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian ini (Alam *et al.*, 2013).

## 2.8.2 Metode *in vivo*

**2.8.2.1 Metode *ferric reducing ability of plasma*.** Aktivitas antioksidan menggunakan metode ini diperkirakan dengan mengukur peningkatan dari absorbansi, hal ini disebabkan oleh reagen FRAP (mengandung TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine) dan  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) yang membentuk ion besi. Absorbansinya dapat diukur secara spektrofotometri pada panjang gelombang 593 nm. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Benzie dan Strain (1996), di mana metode ini melibatkan sampel darah tikus yang diambil dari pleksus vena retroorbital, lalu dimasukkan ke dalam tabung kaca heparinized pada 0, 7 dan 14 hari pengobatan. Buat baru 3 ml reagen FRAP pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dengan cara 1 ml TPTZ 10 mM dalam HCL 40 mM; 1 ml  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  dan 10 ml buffer asetat 0,3 M (pH 3,6) dicampurkan dengan 0,375 ml air suling dan 0,025 ml sampel. Setelah itu absorbansi warna yang terbentuk dalam lapisan organik diukur pada panjang gelombang 593 nm. Dalam metode ini, suhu dijaga pada  $37^\circ\text{C}$  dan pada waktu 180 detik dipilih sebagai pembacaan untuk menghitung nilai FRAP (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.2.2 Metode *reduced glutathione (GSH)*.** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode GSH dapat mengikuti metode dari Ellman (1959), di mana pada metode ini digunakan untuk mengendapkan protein jaringan dengan cara mencampurkan asam trikloroasetat (TCA) 20% yang mengandung EDTA 1 mM dengan homogenat jaringan (dalam dapar fosfat 0,1 M (pH 7,4)), selanjutnya campuran tersebut dibiarkan selama 5 menit dan disentrifugasi selama 10 menit pada 2000 rpm. Supernatan diambil sebanyak 200  $\mu\text{l}$  dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi baru, lalu ditambahkan dengan 1,8 ml reagen Ellman (5,5'-dithiobis-2-asam nitrobenzoat 0,1 mM yang disiapkan dalam buffer fosfat 0,3 M dengan 1% larutan natrium sitrat). Selanjutnya, semua tabung reaksi dibuat dengan volume yang sama, yaitu 2 ml. Setelah itu,

ukur absorbansi larutan pada panjang gelombang 412 nm dan nilai absorbansi larutan dibandingkan dengan kurva standar yang dihasilkan dari metode GSH yang diketahui (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.2.3 Metode *glutathione peroxidase* (GSH-Px).** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ini dapat mengikuti metode dari Wood (1970), di mana metode ini diuji menggunakan *cuvvette* 3-ml yang mengandung 2,0 ml buffer fosfat 75 mM/L (pH 7,0). Larutan tersebut ditambahkan dengan 50  $\mu$ l glutathion reduktase 60 mM/L (30 U/ml), 50  $\mu$ l  $\text{NaN}_3$  0,12 M/L, 0,1 dari 0,15 mM/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 100  $\mu$ l NADPH 30 mM/L, 100  $\mu$ l fraksi sitolik yang diperoleh dari proses sentrifugasi selama 25 menit pada 20.000 g dan air untuk menambahkan volume total hingga 2,9 ml. Setelah itu tambahkan 100  $\mu$ l  $\text{H}_2\text{O}_2$  7,5 mM/L, maka pada penambahan ini reaksi akan dimulai, di mana konversi NADPH menjadi NADP akan diamati dari perubahan absorbansi pada panjang gelombang 340 nm setiap 1 menit selama 5 menit. Aktivitas enzim GSH-Px ini dinyatakan dalam mg protein (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.2.4 Metode *glutathione-S-transferase* (GSt).** Enzim GSt dianggap berperan dalam memulai detoksikasi agen alkilasi potensial dan termasuk senyawa aktif secara farmakologis. Enzim GSt dapat mengkatalisasi reaksi senyawa dengan kelompok  $-\text{SH}$  glutathion, sehingga situs-situs elektrofiliknya dapat dinetralkan dan dapat menjadikan produknya lebih larut dalam air. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode GSt dapat mengikuti metode dari Jocelyn (1972), di mana membuat 1 ml campuran reaksi dengan cara mencampurkan 0,1 N kalium fosfat (pH 6,5); 1 nM/L GSt; 1 M/L 1-kloro-2,4-dinitrobenzena (sebagai substrat) dan sejumlah sitosol yang sesuai (6 mg protein/ml). Lalu, campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu  $37^\circ\text{C}$  dan reaksi ini dimulai ketika penambahan substrat. Selanjutnya, ukur absorbansi pada panjang gelombang 340 nm secara spektrofotometri (Alam *et al.*, 2013).

- 2.8.2.5 Metode *superoxide dismutase* (SOD).** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode SOD dapat mengikuti metode dari Mccord dan Fridovich (1969), di mana membuat lisat eritrosit dari suspensi RBC 5%. Lalu mengambil 50  $\mu$ l lisat dan ditambahkan dengan 75 mM buffer Tris-HCL (pH 8,2), 30 mM EDTA dan 2 mM pirogalol. Selanjutnya, ukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm selama 3 menit menggunakan spektrofotometer. Satu unit dari aktivitas enzim merupakan penghambatan 50% dari laju autooksidasi pirogalol yang ditentukan dari perubahan absorbansi/menit (420 nm). Aktivitas enzim ini dinyatakan sebagai unit/mg protein (Alam *et al.*, 2013).
- 2.8.2.6 Metode *catalase* (CAT).** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode CAT dapat mengikuti metode dari Aebi (1984), di mana aktivitas enzim ini ditentukan dalam lisat eritrosit. Masukkan 50  $\mu$ l lisat ke dalam kuvet yang mengandung 2 ml buffer fosfat (pH 7,0) dan 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 mM. Lalu ukur aktivitas enzimnya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 240 nm selama 1 menit. Koefisien kepunahan molar dari H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 43,6 M/cm digunakan sebagai penentuan aktivitas katalase. Satu unit aktivitas enzim ini sama dengan 1 mmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> yang terdegradasi per menit dan dinyatakan sebagai unit per mg protein (Alam *et al.*, 2013).
- 2.8.2.7 Metode  *$\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity* (GGT).** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode GGT ini dapat mengikuti metode dari Singhal *et al.* (1982), di mana sampel serum dicampurkan ke dalam larutan substrat yang mengandung glisilglisin, MgCl<sub>2</sub> dan  $\gamma$ -Glutamil-p-nitroanilida dalam 0,05 M tris (basa bebas) pada pH 8,2. Selanjutnya, campuran tersebut diinkubasi selama 1 menit pada suhu 37 °C dan absorbansi diukur pada panjang gelombang 405 nm setiap 1 menit selama 5 menit. Aktivitas dari GGT ini dihitung berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh (Alam *et al.*, 2013).

**2.8.2.8 Metode *glutathione reductase* (GR).** Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode GR dapat mengikuti metode dari Kakkar *et al.* (1984), di mana menggunakan hati (sekitar 400 g) dari tikus yang telah dibunuh dengan berat badan 200-250 g. Lalu, hati tersebut dipotong kecil-kecil dan dihomogenisasi ke dalam 9 ml sukrosa sedingin es (0,25 M) per gram hari tikus menggunakan blender. Selanjutnya, homogenat disentrifugasi selama 45 menit pada 14.000 rpm. Pelet diambil dan ditangguhkan dalam volume kecil sukrosa 0,25 M, lalu disentrifugasi lagi. Setelah itu, supernatan dikumpulkan dan disesuaikan pada pH 5,5 menggunakan asam asetat 0,2 M dingin, lalu disentrifugasi lagi selama 45 menit pada 14.000 rpm. Tingkat oksidasi dari NADPH oleh glutathion disulfida (GSSG) pada suhu 30 °C digunakan sebagai ukuran standar dari aktivitas enzimatis. Aktivitas enzim tersebut dinyatakan sebagai unit per mg protein (Alam *et al.*, 2013).

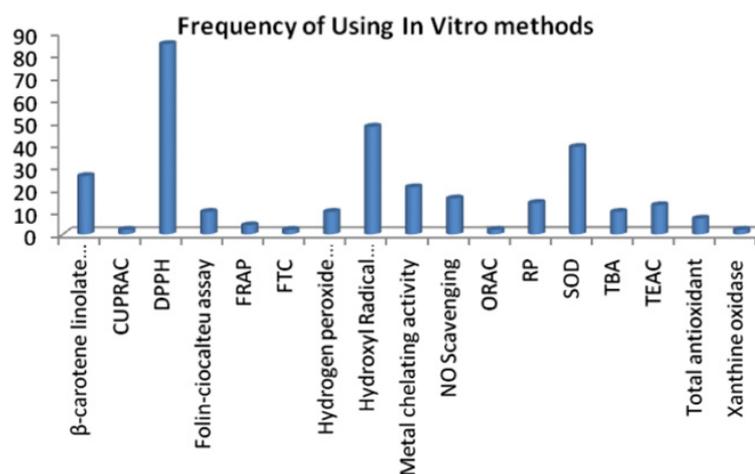
**2.8.2.9 Metode *lipid peroxidation* (LPO).** *Lipid peroxidation* (LPO) merupakan proses autokatalitik yang termasuk konsekuensi umum dari kematian sel. Proses tersebut dapat menyebabkan kerusakan jaringan peroksidatif pada penuaan, toksisitas xenobiotik, peradangan dan kanker. Salah satu produk akhir dari proses ini adalah malondialdehid (MDA) yang terbentuk selama degenerasi oksidatif sebagai produk radikal oksigen bebas (diterima sebagai indikator peroksidasi lipid). Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode LPO dapat mengikuti metode dari Okhawa (1979), di mana jaringan dihomogenisasi ke dalam buffer 0,1 M (pH 7,4) menggunakan homogenizer Teflon-glass. Pada homogenat ini, LPO ditentukan dengan mengukur jumlah MDA. Campurkan 0,2 ml homogenat jaringan; 0,2 ml natrium dodesil sulfat (SDS) 8,1 %; 1,5 ml asam asetat 20% dan 1,5 ml TBA 8%. Tambahkan air suling untuk membuat volume larutan hingga 4 ml dan panaskan campuran tersebut selama 60 menit pada suhu 95 °C di penangas air menggunakan bola kaca kondensor. Setelah itu, tabung

didinginkan hingga mencapai suhu kamar dan volume akhir dibuat sampai 5 ml pada setiap tabung. Campurkan 5 ml butanol : piridin (15 : 1) dan divortex selama 2 menit secara menyeluruh. Selanjutnya disentrifugasi selama 10 menit pada 3000 rpm dan lapisan organik bagian atasnya diambil dan OD diambil pada panjang gelombang 532 nm. Kadar LPO dapat dinyatakan sebagai n mol zat reaktif asam tiobarbiturat (TBARS)/mg protein menggunakan koefisien kepunahan  $1,56 \times 10^5$  ML/cm (Alam *et al.*, 2013).

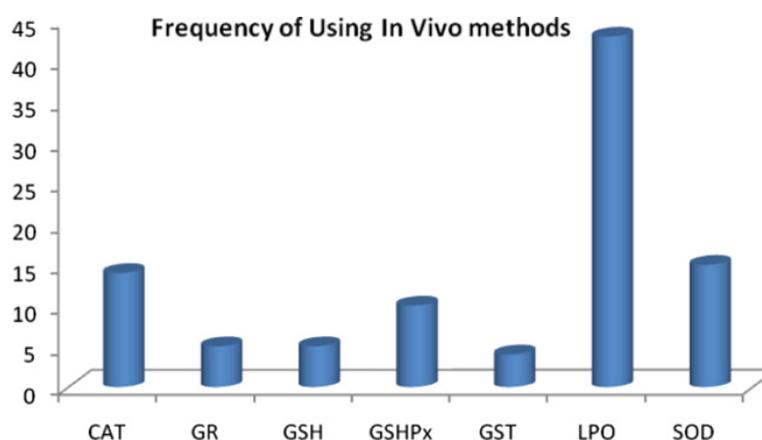
**2.8.2.10 Metode LDL.** Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode LDL dapat mengikuti metode dari Buede dan Aust (1978); El-Saadani *et al.* (1989), di mana LDL yang sudah terisolasi dicuci dan didialisis terhadap 150 mmol/L NaCl dan 1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA pH 7,4 pada suhu 4 °C. Selanjutnya, LDL disterilkan dengan filtrasi (0,45 µM) dan disimpan di bawah nitrogen dalam keadaan gelap pada suhu 4°C. Lalu, inkubasi LDL (100 µg protein/ml) selama 10 menit dengan sampel pada suhu kamar. Setelah itu, tambahkan 5 µmol/L CuSO<sub>4</sub> dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C. Oksidasi dari Cu<sup>2+</sup> diakhiri dengan melakukan penambahan hidroksitoluena butilasi (BHT) 10 µM. Pada akhir inkubasi ini, tingkat oksidasi dari LDL ditentukan oleh pengukuran pada jumlah peroksida lipid yang dihasilkan dan dengan pengujian zat reaktif asam tiobarbiturat (TBARS) pada panjang gelombang 532 nm menggunakan malondialdehid (MDA) sebagai kurva standar (Alam *et al.*, 2013).

Metode invitro yang paling sering digunakan secara berturut-turut adalah DPPH> radikal *hydroxyl*> SOD> *β-carotene linoleic acid* (Gambar 2.9). Namun dari beberapa metode tersebut, DPPH merupakan metode yang paling mudah, sederhana dengan biaya yang memadai, sehingga metode ini memungkinkan telah digunakan sebagian besar untuk pengujian aktivitas antioksidan invitro. Sedangkan metode invivo dengan frekuensi penggunaan yang lebih tinggi adalah metode LPO dan diikuti oleh metode CAT serta

GSH-Px (Gambar 2.10). Lipid merupakan komponen utama dalam membran sel, sehingga peroksidasi hampir secara langsung dapat mengaitkan kerusakan peroksidatif sel *invivo*. Hal inilah yang memungkinkan metode LPO menjadi metode dengan frekuensi penggunaan tertinggi untuk pengujian aktivitas antioksidan *invivo* (Alam *et al.*, 2013).



Gambar 2.9 Frekuensi penggunaan metode invitro pada pengujian aktivitas antioksidan (Alam *et al.*, 2013)

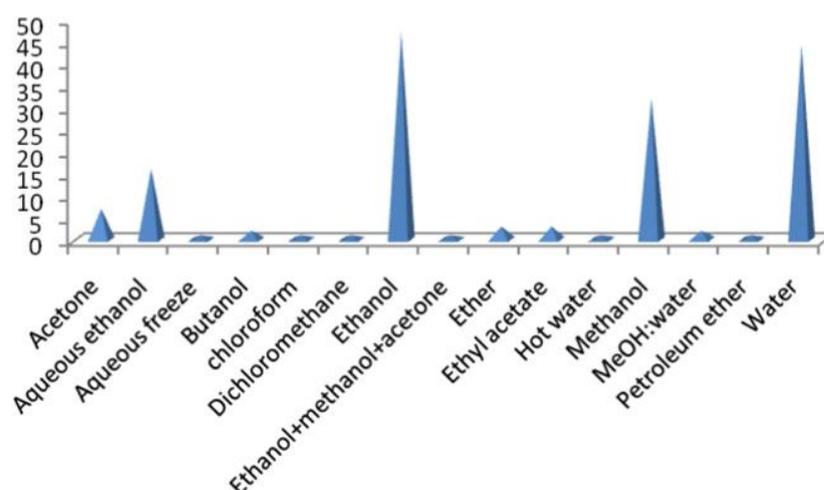


Gambar 2.10 Frekuensi penggunaan metode invivo pada pengujian aktivitas antioksidan (Alam *et al.*, 2013)

## 2.9 Pelarut untuk Pengujian Aktivitas Antioksidan

Adapun beberapa macam pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi sampel pada pengujian aktivitas antioksidan, yaitu aseton, etanol berair, air dingin, butanol, kloroform, diklorometan, etanol, etanol : metanol : aseton,

eter, etil asetat, air panas, metanol, metanol : air, petroleum eter dan air. Namun dari beberapa pelarut tersebut, terdapat empat pelarut yang secara jelas banyak digunakan untuk mengekstraksi sampel pada pengujian aktivitas antioksidan, secara berturut-turut adalah etanol > air > metanol > etanol berair (Gambar 2.11). Etanol, metanol dan air mempunyai polaritas yang baik, hal inilah yang menyebabkan pelarut tersebut digunakan dengan baik untuk mengekstraksi senyawa polar, seperti senyawa fenolik dan senyawa flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut diyakini memiliki aktivitas antioksidan yang efektif. Etanol merupakan senyawa organik yang tidak beracun, sehingga membuat etanol menjadi pelarut dengan frekuensi penggunaan yang paling besar daripada pelarut lainnya. Metanol diketahui memiliki toksisitas, sehingga membatasi penggunaannya dalam beberapa pengujian aktivitas antioksidan. Sedangkan air membutuhkan proses yang berbeda, yaitu dengan pengeringan beku untuk mengeluarkan ekstrak setelah diekstraksi, sehingga membutuhkan proses yang khusus. Pelarut yang memiliki polaritas rendah (seperti aseton, kloroform, dan sebagainya) dan pelarut non polar (seperti eter) frekuensi penggunaannya relatif rendah bahkan sangat rendah, hal ini dikarenakan pelarut tersebut hanya digunakan dalam kasus tertentu dan karena ketersediaan pelarut, sehingga dapat membatasi penggunaannya (Alam *et al.*, 2013).



Gambar 2.11 Frekuensi penggunaan pelarut untuk mengekstraksi sampel dalam pengujian aktivitas antioksidan (Alam *et al.*, 2013)

## 2.10 Desain Penelitian

Desain penelitian merupakan rancangan penelitian yang digunakan dalam rangka memperoleh data dan/atau fakta untuk menjawab pertanyaan atau permasalahan penelitian, di mana rancangan penelitian ini mengandung beberapa komponen yang menyatu satu sama lain (Lapau, 2013). Menurut Sukardi (2004), pengertian desain penelitian terbagi menjadi pengertian secara luas dan pengertian secara sempit. Desain penelitian dalam pengertian secara luas adalah semua proses yang dibutuhkan dalam perencanaan dan pelaksanaan penelitian, di mana komponen desain penelitian dapat mencakup semua struktur penelitian mulai dari ditemukannya ide sampai diperolehnya hasil penelitian. Sedangkan desain penelitian dalam pengertian secara sempit adalah penggambaran secara jelas terkait hubungan antara variabel, pengumpulan data dan analisis data (Nasrudin, 2019).

Studi penelitian eksplorasi merupakan salah satu jenis desain penelitian. Studi eksplorasi ini dapat membuat desain penelitian menjadi fleksibilitas, di mana ketika masalah penelitian pada awalnya diartikan secara luas diubah menjadi satu dengan makna yang lebih tepat. Adapun salah satu metode dalam studi penelitian eksplorasi, yaitu survei yang berkaitan dengan literatur. Metode survei yang berkaitan dengan literatur atau studi pustaka ini merupakan metode yang paling sederhana dan bermanfaat untuk merumuskan masalah penelitian atau mengembangkan hipotesis dengan tepat (Duli, 2019).

## 2.11 Teknik Pengumpulan Data

Pengumpulan data merupakan salah satu kegiatan penting dalam suatu penelitian, di mana pengumpulan data ini dijadikan sebagai bahan analisis untuk menjawab tujuan penelitian. Menurut Sugiyono (2015) terdapat berbagai teknik pengumpulan data yang dapat dilakukan, yaitu studi pustaka, wawancara, observasi dan dokumentasi (Rahmasari *et al.*, 2019).

Studi literatur dapat disebut juga dengan studi pustaka atau studi kepastakaan atau *literature review* atau *library research* (Haryanto *et al.*, 2000; Hermawan, 2019; Maryati & Suryawati, 2001; Zed, 2014; Zohrahayaty *et al.*, 2019). Studi literatur merupakan bagian dari sebuah karya tulis ilmiah yang berisi referensi ilmiah dan pembahasan-pembahasan penelitian terdahulu terkait dengan penelitian dalam karya tulis tersebut. Studi literatur merupakan segala usaha yang dilakukan peneliti untuk menghimpun atau merangkum informasi relevan dengan topik atau masalah yang akan diteliti atau sedang diteliti. Apabila peneliti telah mendapatkan literatur yang relevan, maka peneliti dapat segera menyusunnya secara teratur melalui beberapa proses umum, seperti mengidentifikasi teori secara sistematis, penemuan literatur dan menganalisis data terkait topik penelitian. Ditinjau dari sumbernya, studi literatur dapat dibedakan menjadi kepastakaan konseptual dan kepastakaan penelitian. Kepustakaan konseptual adalah kepastakaan yang memuat teori-teori atau konsep-konsep pada artikel dan buku-buku yang ditulis oleh para ahli, di mana dalam penyampaian tersebut sangat ditentukan oleh pengalaman atau ide-ide dari para ahli. Sedangkan kepastakaan penelitian memuat laporan penelitian yang telah diterbitkan baik pada majalah ilmiah maupun jurnal (Hermawan, 2019). Studi literatur merupakan metode yang dianggap lebih praktis dan lebih murah, di mana seorang peneliti hanya membutuhkan ketekunan dalam mengunjungi berbagai sumber data (Maryati & Suryawati, 2001). Berikut merupakan uraian terkait studi literatur, yaitu:

### **2.11.1 Manfaat studi literatur**

Terdapat beberapa manfaat ketika seseorang melakukan studi literatur, di antaranya dapat memperdalam pengetahuan seseorang tentang topik dan bidang (*subject area*) yang diteliti, dapat mengetahui hasil penelitian terkait yang pernah dilaksanakan sebelumnya (*related research*), dapat mengetahui perkembangan ilmu dari bidang yang kita inginkan/pilih (*state-of-the-art*) dan dapat memperjelas masalah yang terdapat dalam penelitian (Zohrahayaty *et al.*, 2019).

### **2.11.2 Bagian studi literatur**

Studi literatur terdiri dari bagian pembuka, bagian tubuh/isi dan bagian penutup, di mana:

**2.11.2.1 Bagian pembuka.** Bagian pembuka pada studi literatur memuat pendahuluan, yang mana pendahuluan tersebut menjelaskan latar belakang masalah. Selanjutnya menjelaskan tentang rumusan masalah, tinjauan singkat dan tujuan atau manfaat yang diharapkan ataupun yang ingin dicapai pada studi literatur tersebut (Haryanto *et al.*, 2000).

**2.11.2.2 Bagian tubuh/isi.** Bagian tubuh/isi pada studi literatur memuat uraian masalah dan pembahasan atau diskusi. Uraian masalah tersebut memuat berbagai teori terkait masalah yang akan dibahas. Sedangkan dalam pembahasan, membandingkan teori-teori yang sudah didapat dan bagaimana pendapat penulis itu sendiri mengenai hal ini. Namun, penyusunan bagian pembahasan ini sering menjadi keluhan oleh para penulis, hal ini dikarenakan para penulis karangan ilmiah menganggap bagian ini adalah bagian yang sukar. Kemungkinan besar kesukaran tersebut disebabkan oleh tidak tepatnya pemilihan masalah (Haryanto *et al.*, 2000).

**2.11.2.3 Bagian penutup.** Bagian penutup pada studi literatur dapat memuat kesimpulan yang berisikan jalan keluar dalam penyelesaian masalah yang telah dibahas. Kesimpulan tersebut umumnya terlihat sebagai pernyataan yang singkat dan jelas. Apabila kesimpulan tidak ada dikarenakan sesuatu sebab, maka bagian penutup ini dapat berupa ringkasan, di mana ringkasan adalah uraian penting dalam karangan ilmiah tersebut. Perlu digarisbawahi bahwa ringkasan bukan merupakan pengulangan dari pendahuluan dan tidak mengemukakan suatu hal yang baru. Bagian penutup ini sering juga memuat saran, walaupun hal tersebut tidak mutlak harus ada dan apabila saran tidak ada, maka jangan dipaksakan. Bagian penutup kadang-kadang juga dapat mencantumkan ucapan terimakasih (Haryanto *et al.*, 2000).

**2.11.2.4 Sumber studi literatur.** Sumber studi literatur didapat melalui referensi umum, sumber primer dan sumber sekunder. Referensi umum adalah sumber informasi yang dijadikan sebagai rujukan pertama oleh peneliti (seperti buku, artikel tertentu, karangan ilmiah dan dokumen lainnya) yang berkaitan langsung dengan pertanyaan atau masalah penelitian. Sumber primer adalah sumber informasi yang didapat dari publikasi seseorang yang melakukan penelitian-penelitian dan kemudian diterbitkan, di mana penulis secara langsung mengkomunikasikan temuan tersebut kepada pembaca. Sumber primer dalam penelitian pendidikan adalah jurnal, di mana jurnal ini ada yang diterbitkan bulanan, tiga kali setahun dan artikel yang merupakan laporan hasil penelitian. Sedangkan sumber sekunder adalah sumber informasi yang didapat dari publikasi penulis yang mendeskripsikan hasil karya orang lain. Sumber informasi sekunder dapat meliputi buku tahunan, buku (*text books*), kajian penelitian atau ensiklopedia pendidikan. Bagi peneliti dianjurkan untuk mencari referensi umum terlebih dahulu dan kemudian mencari informasi dari sumber primer maupun sumber sekunder (Hermawan, 2019).

**2.11.2.5 Jenis-jenis literatur.** Jenis-jenis literatur yang dapat digunakan sebagai sumber informasi ketika ingin melakukan studi literatur antara lain:

1. Paper dari jurnal, prioritaskan mengambil sumber informasi pada paper jurnal yang sudah terindeks oleh Scopus dan ISI
2. Paper dari *Book Chapter*
3. Paper dari *conference (proceedings)*
4. Disertasi, tesis atau skripsi
5. Laporan (*report*) dari organisasi yang terpercaya
6. Buku (*text books*)

(Zohrahayaty *et al.*, 2019)

Paper dapat terbagi menjadi *survey paper* dan *technical paper*. *Survey paper* merupakan jenis paper yang dapat dijadikan rujukan maupun panduan penting bagi peneliti yang baru memulai penelitiannya dalam memahami topik atau tema secara komprehensif, di mana paper jenis ini memuat tentang *review* dan *survey* terkait topik atau tema suatu penelitian. Sedangkan *technical paper* adalah jenis paper yang memuat hasil penelitian dan eksperimen seorang peneliti dalam melakukan penelitian, di mana penilaian kualitas paper jenis ini dari kontribusi ke pengetahuan (Zohrahayaty *et al.*, 2019).

**2.11.2.6 Sumber-sumber literatur/database.** Sumber database dapat berasal dari sumber internasional dan sumber nasional. Sumber international yang merupakan langganan dari Lembaga Pemerintahan Indonesia, baik Lembaga Kementrian maupun Non Kementrian dapat dilihat pada Tabel 2.2. Sedangkan sumber database nasional yang dapat dikunjungi adalah Portal Garuda dan Indonesia Onesearch (Yoganingrum *et al.*, 2019).

Tabel 2.2 Sumber database international langganan Lembaga Negara

No	Sumber database	Tahun berlangganan	Lembaga
1	Scopus	2017-sekarang	Kementrian
2	Web of Science	2019	Riset,
3	Science Direct	2015-sekarang	Teknologi dan
4	Ebsco	2009-sekarang	Pendidikan
5	Proquest	2009-sekarang	Tinggi
6	Springer Nature	2014-sekarang	Lembaga Ilmu
7	JSTOR	2016-sekarang	Pengetahuan Indonesia
8	Alexander Street Press	Tergabung dalam	Perpustakaan
9	Alexander Street Video	e-resources sejak	Nasional
10	Brill Online	2013-sekarang	
11	Cambridge University Press		
12	Cengage Learning		
13	Ebrary		
14	Ebsco Host		

No	Sumber database	Tahun berlangganan	Lembaga
15	IGI Global		
16	IG Library		
17	Lexis Nexis		
18	Myilibrary		
19	Proquest		
20	Sage Knowledge		
21	Taylor & Francis		
22	Science Direct		
23	Britannica Library		
24	American Library Association		
25	American Society for Training and Development		
26	Amsterdam University Press		
27	Business Expert		
28	Columbia University Press		
29	Hawai		
30	ISEAS		
31	Liverpool University Press		
32	Nias Press		
33	Princeton University Press		
34	RIBA Architecture		
35	University of California Press		
36	Westlaw		
37	Wiley Online Library		
38	Springer Nature		
39	McGraw Hill eBook Library		
40	CNKI		

(Yoganingrum *et al.*, 2019)

Dokumentasi adalah teknik pengumpulan data yang tidak langsung ditujukan pada subjek penelitian. Dokumentasi ini diperlukan sebagai tahap tersendiri, yaitu studi pendahuluan dalam rangka memahami berbagai teori dan lebih menangkap gejala-gejala baru yang berkembang dalam masyarakat ataupun dalam lapangan (Syawaludin, 2017).

Terdapat beberapa mesin indeks yang dapat digunakan untuk mengindeks jurnal, antara lain *Google Scholar*, *Scopus*, *Web of Science*, *Dimensions*, *Sinta*, *Scival* dan *Directory of Open Access Journal (DOAJ)*. Adapun salah satu perangkat data yang dikembangkan oleh startup berbasis di London adalah *Mendeley*. Perangkat ini merupakan aplikasi yang dapat digunakan untuk mengelola sitasi dan referensi. Kekuatan *Mendeley* terletak pada jaringan dan juga fitur kolaboratifnya serta dalam menyediakan fasilitas pengelolaan file PDF dengan mudah. Aplikasi ini menawarkan versi web dan desktop dengan informasi bibliografi yang disinkronkan, sehingga memungkinkan akses dari beberapa komputer dan kolaborasi dengan pengguna lainnya. Pada *Mendeley*, file PDF dapat diimpor ke desktop *Mendeley* dan aplikasi tersebut dapat mendata (seperti penulis, judul) dan dapat mengekstraksi jurnal secara otomatis. Perangkat ini memungkinkan untuk melakukan pencarian teks lengkap, dapat menyorot teks di dalam PDF dan dapat menambah catatan sampel (Yoganingrum *et al.*, 2019).

## **2.12 Analisis Data**

Analisis data merupakan proses yang bertujuan untuk menyusun data dengan cara yang bermakna, sehingga data yang didapat mudah untuk dipahami. Para peneliti menyatakan bahwa tidak ada cara yang paling benar secara absolut dalam mengorganisasi, menganalisis dan menginterpretasikan data. Oleh karena itu, tahapan analisis data disesuaikan dengan tujuan penelitian. Adapun metode yang dapat mempermudah dalam menganalisis data, yaitu metode statistika. Statistika merupakan serangkaian metode yang digunakan untuk mengumpulkan, menganalisa, menyajikan dan memberikan makna pada data. Langkah yang dapat digunakan untuk analisis data statistik adalah menentukan masalah (menjadi obyek penelitian atau pengamatan), mengumpulkan data, melakukan analisa dan menyajikan hasil (Situmorang *et al.*, 2010).

### **2.13 Kesimpulan dan Saran**

Kesimpulan dan saran dalam penelitian harus bersifat spesifik yang merujuk kepada temuan penelitian dan pembahasan. Dalam pembuatan kesimpulan dan saran, hindari bersifat umum (Nurdin & Hartati, 2019). Kesimpulan adalah pernyataan yang singkat, jelas dan sistematis dalam sebuah penelitian yang mencakup keseluruhan hasil analisis, pembahasan serta pengujian hipotesis. Kesimpulan ilmiah harus berdasarkan pada hasil penelitian, karena pada kesimpulan ini peneliti berusaha memberikan jawaban dari masalah penelitian (Maryati & Suryawati, 2001). Peneliti dalam merumuskan kesimpulan dapat menggunakan logika deduktif dan logika induktif, di mana:

#### **2.13.1 Kesimpulan berdasarkan logika deduktif**

Logika deduktif disebut juga dengan logika umum-khusus yang merupakan suatu proses berpikir mulai dari suatu hal umum ke hal-hal yang khusus. Pengambilan kesimpulan berdasarkan logika deduktif dimulai dari teori yang digunakan, lalu teori tersebut dihubungkan dengan data-data yang diperoleh. Dengan demikian, peneliti dapat memperoleh kesimpulan. Contoh dari kesimpulan berdasarkan logika deduktif adalah premis 1 (langit mendung maka hari akan hujan), premis 2 (hari ini langit mendung), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa hari ini akan hujan (Maryati & Suryawati, 2001).

#### **2.13.2 Kesimpulan berdasarkan logika induktif**

Logika induktif merupakan logika berpikir yang dimulai dari sesuatu hal spesifik, sehingga dapat terlihat pola yang terjadi. Selanjutnya, pola ini dapat dijadikan kesimpulan dalam sebuah penelitian. Contoh dari kesimpulan berdasarkan logika induktif adalah bukti 1 (senin hujan), bukti 2 (selasa hujan), bukti 3 (rabu hujan), bukti 4 (kamis hujan), sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa kemungkinan hari jumat hujan (Maryati & Suryawati, 2001).

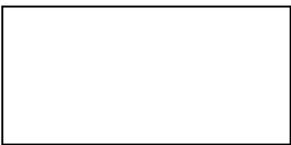
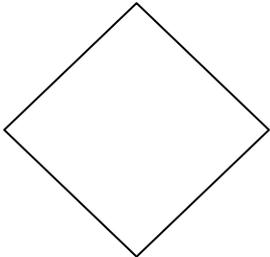
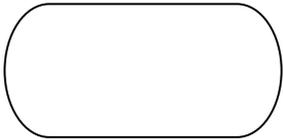
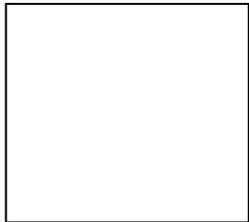
Saran merupakan anjuran yang dapat menyangkut aspek, operasi, kebijakan dan konsep. Hendaknya, saran yang diberikan tidak keluar dari batas lingkup dan implikasi penelitian. Selain itu, saran harus berdasarkan pada data hasil penelitian, yang dalam hal ini berdasarkan pada kesimpulan. Adapun syarat dalam pembuatan saran, yaitu memuat masukan-masukan tentang pemecahan masalah penelitian; saran disesuaikan dengan kegunaan dari penelitian, untuk pengembangan ilmu pengetahuan, praktisi dan pemerintahan; saran hendaknya bersifat konkrit, realistis, praktis dan terarah; adanya peluang untuk penelitian lanjutan (Nurdin & Hartati, 2019).

#### **2.14 Diagram Alir**

Diagram alir dapat disebut juga dengan bagan alir atau bagan alir atau *flowchart* (Roberts & Greene, 2009; Rusmawan, 2019; Utami & Sukrisno, 2005). Diagram alir merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk menyajikan serangkaian peristiwa dalam proses atau layanan yang diberikan, di mana penyajian tersebut disajikan dalam bentuk diagram alir (Roberts & Greene, 2009). Diagram alir adalah representasi suatu algoritma atau prosedur untuk menyelesaikan suatu masalah secara grafik. Diagram alir ini dapat memudahkan kita ketika melakukan pengecekan pada bagian-bagian yang terlupakan dalam analisis suatu masalah (Utami & Sukrisno, 2005). Adapun definisi diagram alir menurut pandangan beberapa para ahli, di antaranya Jogiyanto (2005) menyatakan bahwa diagram atau bagan alir adalah suatu bagan (*chart*) yang menunjukkan alir atau arus (*flow*) dalam program ataupun prosedur sistem secara logika. Sariadin Siallagan (2009) menyatakan bahwa diagram alir adalah suatu diagram atau bagan alir yang menggunakan simbol atau tanda untuk menyelesaikan suatu masalah. Pahlevi (2010) menyatakan bahwa diagram alir adalah suatu gambaran dalam bentuk diagram alir yang berasal dari algoritma-algoritma dalam suatu program, di mana diagram alir ini menyatakan arah alur dari program tersebut. Krismiaji (2010) menyatakan bahwa diagram alir adalah teknik analitis yang dapat digunakan untuk menjelaskan secara jelas, tepat dan logis tentang aspek-aspek dalam sistem informasi. Sedangkan Indrajani

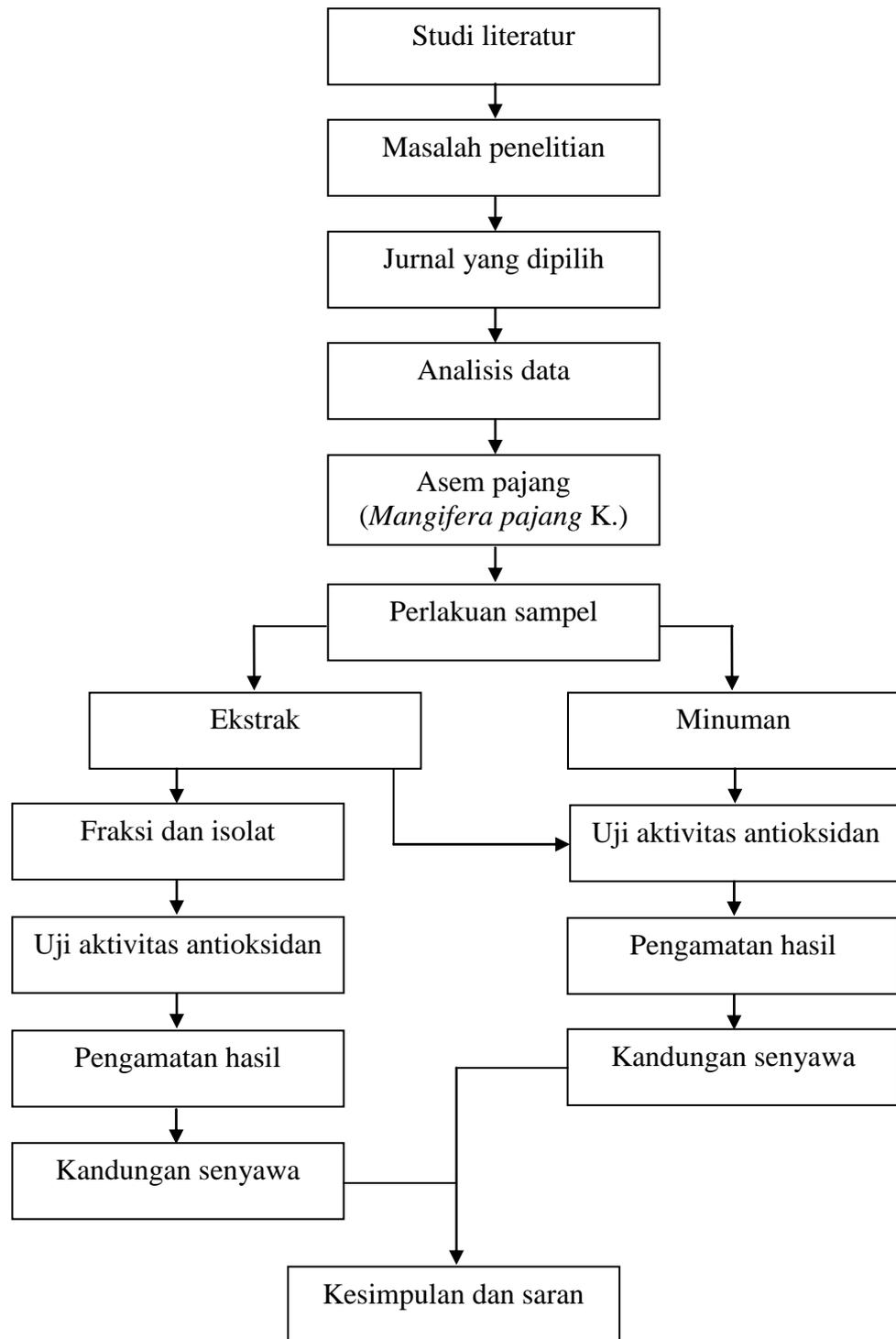
(2011) menyatakan bahwa diagram alir adalah suatu gambaran langkah-langkah dan urutan prosedur suatu program yang digambarkan secara grafik (Rusmawan, 2019). Simbol-simbol yang dapat digunakan dalam membuat diagram alir disajikan dalam Tabel 2.3.

Tabel 2.3 Simbol-simbol diagram alir

No	Simbol	Fungsi	Keterangan
1		Langkah/proses	Simbol ini menyatakan kegiatan yang akan ditampilkan pada diagram alir
2		Titik keputusan	Perlu adanya keputusan dan kondisi tertentu. Pada titik ini, selalu ada dua keluaran untuk melanjutkan aliran kondisi yang berbeda
3		Keluaran data/masukan	Mewakili data yang masuk dan data yang keluar
4		Terminasi	Menunjukkan awal ataupun akhir sebuah proses
5		Garis alir	Menunjukkan arah aliran proses ataupun algoritma
6		Kontrol/inspeksi	Menunjukkan langkah/proses di mana ada pengontrolan atau inspeksi

(Rusmawan, 2019)

### 2.15 Kerangka Konsep



Gambar 2.12 Kerangka konsep penelitian