

II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Morfologi dan Taksonomi Sambung Nyawa (*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.)

Sambung nyawa merupakan tanaman perdu tegak jika masih muda, dan merambat jika sudah cukup tua, berperawakan herba berdaging. Batang segiempat beruas-ruas berwarna hijau dengan bercak ungu. Daunnya berupa daun tunggal berbentuk elips memanjang, tersebar, tepi daun bertoreh, berambut halus, panjang tangkai 0,5-3,5 cm, helaian daun 3,5-12,5 cm dengan bagian atas berwarna hijau muda mengkilat, tulang daun menyirip, dan menonjol pada permukaan daun bagian bawah, dan lebar daunnya 1,5-5 cm. Susunan bunga majemuk cawan berwarna orange-kuning, mahkota bertipe tabung berwarna hijau atau jingga, benang sari berbentuk jarum berwarna kuning dengan kepala sari berlekatan menjadi satu, dan brachtea involucralis berbentuk garis berujung runcing atau tumpul (van Steenis dkk., 1975 ; Backer dan van den Brink, 1965).

Sambung nyawa diduga berasal dari Myanmar dan tersebar sampai Tiongkok serta Asia Tenggara (Jawa, Kalimantan, dan Filipina) (Sudarto, 1990). Di Jawa banyak ditemukan pada ketinggian 1-1200 m dpl, terutama tumbuh dengan baik pada ketinggian 500 m dpl, banyak tumbuh di selokan, semak belukar, hutan terang, dan padang rumput (Backer dan van den Brink, 1965). Tanaman sambung nyawa umumnya dapat dipanen setelah umur 4 bulan, kemudian dilakukan peremajaan hingga dapat dipanen selama 4 tahun (Aryanti dkk., 2007).

Kedudukan taksonomi sambung nyawa menurut Backer dan van den Brink

(1965) :

Kerajaan	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: <i>Gynura</i>
Jenis	: <i>Gynura procumbens</i> (Lour.) Merr.



(a) (b) (c) (d)

Gambar 1. Tanaman Sambung Nyawa (a) Daun (b) Batang (c) Akar (d) Bunga
(Dokumentasi pribadi, 2014; Zadel, 2013; Richter, 2014)

B. Kandungan Kimia Sambung Nyawa

Penelitian Akowuah dkk. (2002), menunjukkan bahwa daun sambung nyawa mengandung flavonoid, saponin, tanin, dan terpenoid. Suganda dkk. (1988), mengemukakan bahwa daun sambung nyawa mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, steroid, triterpenoid, asam klorogenat, asam kafeat, asam vanilat, asam para kumarat, dan asam p-hidroksi benzoat. Menurut Jenie dkk. (2014), sambung nyawa mengandung sterol, glikosida sterol, quercetin, kaempferol -3- O-neohesperidosida, kaempferol -3- glukosida, quercetin -3- rhamnosyl (1-6)

galaktosida, dan quercetin-3-rhamnosyl (1-6) glukosida. Menurut Wahyuningsih (2004), senyawa yang terkandung dalam sambung nyawa mempunyai aktivitas dalam memerangkap radikal bebas, yang dapat digunakan sebagai antioksidan. Menurut Rahman dan Asad (2013), kandungan antioksidan dari daun sambung nyawa dapat diketahui dengan ekstraksi menggunakan *n-hexane*, *dichloromethane*, *methanol*, dan *ethyl acetate*.

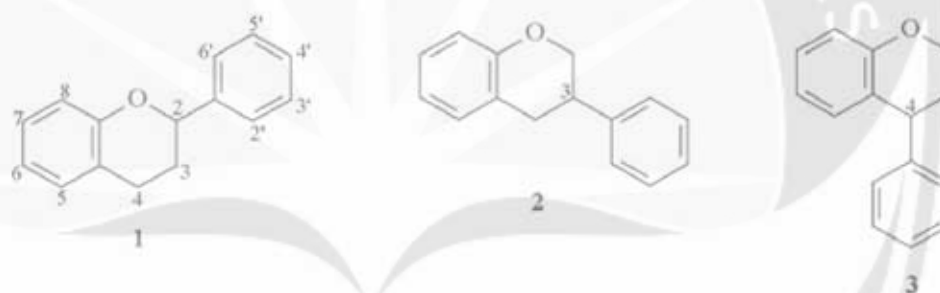
1. Flavonoid

Menurut Marais dkk. (2006) flavonoid biasanya digunakan untuk menjelaskan produk yang dihasilkan tanaman yang termasuk ke dalam senyawa dengan rumus kimia $C_6-C_3-C_6$. Menurut Marston dan Hostettmann (2006), senyawa flavonoid memiliki ikatan glikosida yang dapat didegradasi oleh aktifitas enzim yang didapatkan dari bahan tanaman baik dalam bentuk segar maupun kering. Ekstraksi flavonoid dibutuhkan pelarut yang sesuai dengan kepolarannya. Beberapa flavonoid ada yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon yang termetilasi, dan flavonol yang dapat diekstraksi dengan pelarut kloroform, diklorometana, dietil eter, atau etil asetat, namun flavonoid glikosida dan aglikone yang lebih polar dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut alkohol atau campuran alkohol-air.

Menurut Harborne (1987), flavonoid merupakan senyawa fenol yang dapat berubah bila ditambahkan senyawa yang bersifat basa atau ammonia. Flavonoid di alam merupakan senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Flavonoid umumnya

terdapat dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavonoid. Ikatan senyawa flavonoid dengan gula menyebabkan banyaknya bentuk kombinasi yang dapat terjadi di dalam tumbuhan, sehingga flavonoid pada tumbuhan jarang ditemukan dalam keadaan tunggal, flavonoid sering terdapat campuran yang terdiri dari flavonoid yang berbeda kelas.

Flavonoid yang terdiri dari rangkai karbon $C_6-C_3-C_6$, terdiri dari beberapa bentuk dasar, yang dilihat dari posisi cincin aromatiknya. Menurut Grotewold (2006), flavonoid dibagi menjadi tiga bentuk dasar antara lain :



Gambar 2. Struktur Flavonoid
Keterangan : 1. Flavonoid, 2. Isoflavonoid, dan 3. Neoflavonoid
(Sumber : Grotewold, 2006)

Kegunaan dari flavonoid bagi kesehatan diantaranya adalah aktivitas antioksidan, kemampuan mengikat logam, stimulasi dari sistem imun, pencegahan nitrosasi tirosin, antialergi, antibakterial, dan antikarsinogenik (Merken dkk., 2001).

2. Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol dan telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif

permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah (Harborne, 1987). Saponin adalah glikosida yang aglikonnya disebut sapogenin (Gunawan dan Mulyani, 2004).

Berdasarkan struktur dari aglikonnya, saponin dapat dibedakan menjadi dua macam, yaitu saponin steroid dan saponin triterpenoid. Saponin steroid mudah larut dalam air dan alkohol, tetapi tidak larut dalam eter. Saponin steroid tersusun dari suatu aglikon steroid (sapogenin) yang terikat pada suatu oligosakarida yang biasanya heksosa dan pentosa (Farnsworth, 1966).

3. Tanin

Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul cukup tinggi (lebih dari 1000) dan dapat membentuk kompleks dengan protein. Tanin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh, dalam angiospermae terdapat khusus dalam jaringan kayu. Dalam tumbuhan, tanin terpisah dari protein dan enzim sitoplasma, bila jaringan tumbuhan rusak, maka dapat terjadi reaksi penyamakan. Tanin memiliki efek beragam pada sistem biologis karena dapat berperan sebagai pengendap protein, pengkkelat logam dan antioksidan biologis (Hagerman, 2002 ; Harborne, 1987).

4. Triterpenoid

Triterpenoid merupakan senyawa yang tidak memiliki warna, berbentuk kristal, memiliki titik leleh yang tinggi dan merupakan senyawa optik aktif, yang sukar dicirikan karena tidak memiliki kereaktifan kimia.

Triterpenoid memiliki kerangka karbon yang berasal dari enam satuan isoprena dan secara biosintesis diturunkan dari hidrokarbon C_{30} asiklik, yaitu skualena. Triterpenoid dapat diklasifikasikan menjadi empat golongan besar yaitu, triterpena, steroid, saponin, dan glikosida jantung atau kardenolida (Harborne, 1987).

C. Kegunaan Sambung Nyawa

Menurut Permadi (2008), efek farmakologis sambung nyawa diperoleh dari penggunaan daun. Daun sambung nyawa oleh sebagian masyarakat Indonesia digunakan sebagai obat kanker kandungan, kanker payudara, dan kanker darah (Meiyanto 1996). Selain itu, sambung nyawa dimanfaatkan sebagai antikoagulan, mencairkan pembekuan darah, menghentikan pendarahan, menghilangkan panas, dan infeksi kerongkongan (Wijayakusuma dkk., 1992). Dalimartha (1999), mengemukakan bahwa daun sambung nyawa dapat untuk mengatasi batu ginjal, darah tinggi, dan kencing manis.

Secara *in vivo*, flavonoid yang terabsorpsi akan aktif menghambat radikal bebas yang diakibatkan oleh sitotoksitas oleh peroksidasi lemak (Yuting dkk., 1990). Secara *in vitro*, flavonoid menghambat peroksidasi lemak, pada tahap inisiasi berperan sebagai pengikat anion superoksida dan radikal hidroksil (Afanas'ev dkk., 1989).

D. Metode Ekstraksi Senyawa

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa terlarut (*solut*) ke dalam pelarut (*solvent*). Senyawa yang bersifat anorganik atau disebut senyawa polar dapat terlarut oleh pelarut polar, sedangkan senyawa organik atau non-polar dapat terlarut oleh pelarut non-polar. Sifat tersebut dikenal dengan istilah *like dissolve like* (Pecsok dkk., 1976). Menurut Harborne (1987), ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan jenis senyawa yang diisolasi. Umumnya sebelum dilakukan ekstraksi, pencegahan akan oksidasi maupun hidrolisis senyawa dalam tumbuhan perlu dilakukan dengan cara pengeringan atau perendaman dengan etanol mendidih.

Pengeringan tumbuhan dilakukan dalam keadaan terawasi untuk mencegah terjadinya perubahan kimia yang terlalu banyak. Tumbuhan yang dikeringkan harus dilakukan secepat-cepatnya, tanpa menggunakan suhu tinggi dan memiliki aliran udara yang baik. Setelah tumbuhan kering, tumbuhan dapat disimpan untuk jangka waktu yang lama sebelum dianalisis (Harborne, 1987). Ekstraksi menggunakan pelarut yang sedikit dan dilakukan berulang kali akan menghasilkan hasil ekstraksi yang lebih baik daripada ekstraksi satu kali dengan pelarut yang banyak (Pecsok dkk., 1976).

Menurut Agoes (2007), ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya menggunakan *menstrum* (pelarut atau campuran pelarut) dan larutan ekstrak yang diperoleh disebut dengan *micella*. Menurut Harborne (1987), metode ekstraksi dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu ekstraksi sederhana dan ekstraksi khusus. Ekstraksi sederhana terdiri dari maserasi, perkolasi, reperkolasi, evakolasi, dan dialokasi. Ekstraksi khusus terdiri dari sokletasi, arus balik, dan ultrasonik.

Ekstraksi sederhana merupakan ekstraksi menggunakan pelarut namun tidak menggunakan tambahan perlakuan lain seperti panas, misal maserasi yang dapat disebut dengan ekstraksi dingin, sedangkan ekstraksi khusus menggunakan perlakuan lain seperti pemanasan atau pemecahan sel menggunakan ultrasonik dalam mendapatkan senyawa yang diinginkan (Moelyono, 1996).

1. Maserasi

Menurut Darwis (2000), maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruangan (20-26°C). Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang digunakan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut.

Menurut Meloan (1999) dalam Yuningsih (2007), kelebihan metode maserasi diantaranya metodenya sederhana, tidak memerlukan alat yang rumit, relatif murah, dan dengan metode ini dapat menghindari kerusakan komponen senyawa karena tidak menggunakan panas sehingga baik untuk sampel yang tidak tahan panas. Kelemahan metode ini antara lain adalah dari segi waktu yang lebih lama dan penggunaan pelarut yang tidak efektif dan efisien karena jumlah pelarut yang digunakan relatif banyak.

Menurut Voigt (1994), pembuatan ekstrak dengan metode maserasi mengikuti syarat yaitu bahan dihaluskan dengan cara dipotong-potong atau dibuat serbuk, kemudian disatukan dengan bahan pengekstraksi. Waktu lamanya maserasi berbeda-beda, masing-masing farmakope mencantumkan 4-10 hari, menurut pengalaman 5 hari sudah memadai. Selama maserasi bahan disimpan di tempat yang terlindungi dari cahaya langsung untuk mencegah reaksi perubahan warna.

Penggunaan metode maserasi dalam ekstraksi fitokimia sebagai antioksidan telah banyak dilakukan salah satunya adalah penelitian yang dilakukan Yuliarti dkk. (2013), yaitu mengisolasi, mengidentifikasi, dan menguji antioksidan daun tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) menggunakan maserasi dengan variasi pelarut n-hexane dan etanol. Penelitian lain yang menggunakan metode maserasi adalah penelitian yang dilakukan Mokoginta dkk. (2013), menguji aktivitas penangkal radikal bebas ekstrak metanol kulit biji pinang yaki (*Areca vestiaria* Giseke).

2. Sokletasi

Menurut Darwis (2000), sokletasi merupakan proses ekstraksi yang menggunakan penyarian berulang dan pemanasan. Penggunaan metode sokletasi adalah dengan cara memanaskan pelarut hingga membentuk uap dan membasahi sampel. Pelarut yang sudah membasahi sampel kemudian akan turun menuju labu pemanasan dan kembali menjadi uap untuk membasahi sampel, sehingga penggunaan pelarut dapat dihemat karena

terjadi sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Proses ini sangat baik untuk senyawa yang tidak terpengaruh oleh panas.

Menurut Harborne (1987), keuntungan ekstraksi dengan cara sokletasi adalah pelarut yang digunakan lebih sedikit dan waktu yang dibutuhkan lebih sedikit daripada dengan maserasi atau perkolasi. Kerugian cara ini adalah tidak dapat digunakan untuk senyawa-senyawa yang termolabil.

Penggunaan metode sokletasi dalam ekstraksi telah banyak dilakukan salah satunya adalah penelitian yang dilakukan Marlina dkk. (2005), yaitu skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis komponen kimia buah labu siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz) dalam ekstrak etanol.

E. Sifat Pelarut dalam Ekstraksi

Dalam ekstraksi dapat digunakan berbagai macam pelarut, akan tetapi penggunaan pelarut toksik harus dihindari. Pelarut yang digunakan dalam mengekstraksi senyawa dapat dipertimbangkan berdasarkan suhu didihnya agar mudah dihilangkan (Agoes, 2007). Menurut Pecsok dkk. (1976) ekstraksi dapat memisahkan dua hingga lebih senyawa tergantung pada perbedaan dalam koefisien penyebaran (*distribution coefficients*) atau konstanta dielektrikum (*Dielectric Constant*) yang dimiliki pelarut tersebut (Tabel 1).

Tabel 1. Pelarut-pelarut yang biasa digunakan dalam ekstraksi senyawa

Pelarut	Titik didih (°C)	Titik beku (°C)	Konstanta dielektrikum (Debye unit)
Diethyl ether	35	-116	4,3
Carbon disulfide	46	-111	2,6
Acetone	56	-95	20,7
Chloroform	61	-64	4,8
Metanol	65	-98	32,6
Tetrahydrofuran	66	-65	7,6
Di-isopropyl eter	68	-60	3,9
Carbon tetrachloride	76	-23	2,2
Ethyl acetate	77	-84	6,0
Ethanol	78	-117	24,3
Benzene	80	5,5	2,3
Cyclohexane	81	6,5	2,0
Isopropanol	82	-89	18,3
Air	100	0	78,5
Dioxane	102	12	2,2
Toluene	111	-95	2,4
Acetic acid (glacial)	118	17	6,2
N,N-Dimethyl formamide	154	-61	34,8
Diethylene glycol	245	-10	34,7

Sumber : Pecsok dkk. (1976)

Pengekstrak organik berdasarkan konstanta dielektrikum dapat dibedakan menjadi dua, yaitu pelarut polar dan pelarut non-polar. Konstanta dielektrikum dinyatakan sebagai gaya tolak-menolak antara dua partikel yang bermuatan listrik dalam suatu molekul. Semakin tinggi konstanta dielektrikunya maka pelarut semakin bersifat polar (Sudarmadji dkk., 1989).

Metanol atau yang lebih dikenal dengan alkohol kayu atau metil alkohol adalah turunan alkohol yang paling sederhana. Metanol merupakan pelarut polar yang memiliki konstanta dielektrikum sebesar 32,60 (Sudarmadji dkk., 1989). Menurut Sumihe dkk. (2014), metanol merupakan salah satu pelarut organik kuat

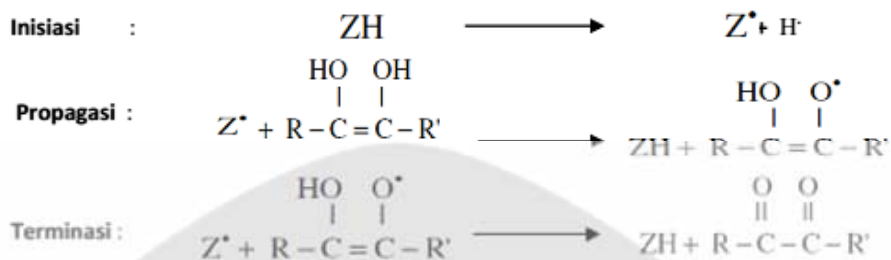
yang mampu melarutkan unsur-unsur bioaktif (termasuk anti-kanker) pada tanaman herba medisinal.

F. Senyawa Radikal Bebas

Menurut Soematmaji (1998), radikal bebas (*free radical*) adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbit luarnya. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa tersebut sangat reaktif mencari pasangan dengan cara menyerang dan mengikat elektron molekul yang berada di sekitarnya. Radikal bebas tersebut dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak, bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Leong dan Shui, 2002).

Secara umum sumber radikal bebas dapat dibedakan menjadi dua, yaitu endogen dan eksogen (Rohmatussolihat, 2009). Radikal bebas endogen dapat terbentuk melalui autoksidasi, oksidasi enzimatik, fagositosis dalam respirasi, transfer elektron di mitokondria dan oksidasi ion-ion logam transisi. Sedangkan radikal bebas eksogen berasal dari luar sistem tubuh, misalnya UV. Di samping itu, radikal bebas eksogen dapat berasal dari aktivitas lingkungan (Rohmatussolihat, 2009).

Terbentuknya senyawa radikal, baik radikal bebas endogen maupun eksogen terjadi melalui sederetan reaksi. Deretan reaksi radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Deretan Reaksi Radikal Bebas
(Sumber : Rohmatussolihat, 2009)

Mula-mula terjadi pembentukan awal radikal bebas (inisiasi), lalu perambatan atau terbentuknya radikal baru (propagasi), dan tahap terakhir yaitu pemusnahan atau pengubahan senyawa radikal menjadi non radikal (terminasi) (Rohmatussolihat, 2009). Radikal bebas yang beredar dalam tubuh berusaha untuk mengikat elektron yang ada pada molekul lain seperti DNA dan sel. Jika radikal bebas banyak beredar, maka akan banyak pula sel yang rusak. Kerusakan yang ditimbulkan dapat menyebabkan sel tersebut menjadi tidak stabil yang berpotensi mempercepat proses penuaan dan kanker (Rohmatussolihat, 2009).

G. Antioksidan

Antioksidan adalah zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh (Rohmatussolihat, 2009). Antioksidan memiliki fungsi untuk menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat di dalam tubuh, sehingga dapat menyelamatkan sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Hernani dan Rahardjo, 2005). Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas dengan

cara memberikan satu elektronnya kepada radikal bebas, sehingga menjadi non-radikal (Rohmatussolihat, 2009).

Berdasarkan sumbernya, antioksidan dibagi dalam dua kelompok yaitu antioksidan alami (antioksidan hasil ekstraksi bahan alami) dan antioksidan sintetis (antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia). Antioksidan alami berasal dari senyawa fenolik seperti golongan flavonoid (Astuti, 2008). Antioksidan sintesis, seperti BHA (*Butylated hydroxyanisole*), BHT (*Butylated hydroxytoluene*), TBHQ (*Tert-butyl hydroquinone*), *Propyl gallate*, dan tokoferol. Antioksidan sintetis tersebut telah diproduksi untuk tujuan komersial (Ayucitra dkk., 2011). Sedangkan berdasarkan mekanisme kerjanya, antioksidan digolongkan menjadi tiga kelompok, yaitu antioksidan primer, sekunder, dan tersier (Winarsi, 2007).

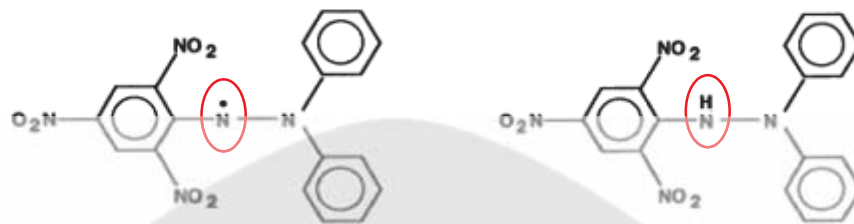
Antioksidan primer disebut juga sebagai antioksidan enzimatis. Antioksidan primer meliputi enzim superoksida dismutase, katalase, dan glutathione peroksidase (Winarsi, 2007). Enzim-enzim ini menghambat pembentukan radikal bebas dengan cara memutus rantai (polimerisasi), dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Antioksidan kelompok ini disebut juga *chain-breaking-antioxidant* (Winarsi, 2007).

Antioksidan sekunder disebut juga antioksidan eksogenus atau non-enzimatis. Cara kerja sistem antioksidan non-enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas (Lampe, 1999). Akibatnya radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler. Contoh antioksidan sekunder ialah vitamin E, vitamin C, flavonoid, asam urat, bilirubin, dan albumin (Lampe, 1999).

Antioksidan tersier contohnya enzim DNA-*repair* dan metionin sulfoksida reduktase yang berperan dalam perbaikan biomolekul yang dirusak oleh radikal bebas (Winarsi, 2007). Kerusakan DNA yang terinduksi senyawa radikal bebas dicirikan oleh rusaknya *single* dan *double strand*, baik gugus basa maupun non-basa. Perbaikan kerusakan basa dalam DNA yang diinduksi senyawa oksigen reaktif terjadi melalui perbaikan jalur eksisi basa (Winarsi, 2007). Eksisi basa merupakan perbaikan DNA dengan cara memotong basa yang rusak (Emmanouil, 2011). Pada umumnya, eksisi basa terjadi dengan cara memotong basa yang rusak, yang dilakukan oleh DNA glikosilase (Winarsi, 2007).

H. Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan Metode DPPH

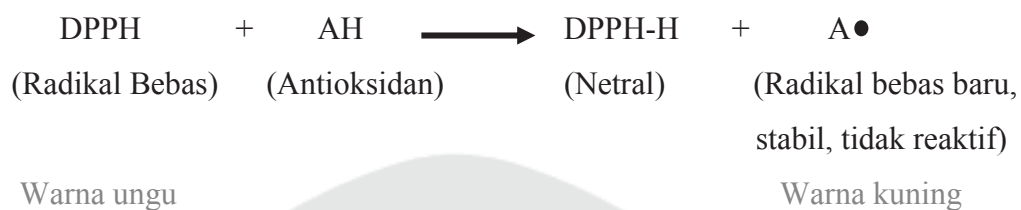
Menurut Bendra (2012), salah satu metode yang umum digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan suatu bahan adalah metode DPPH. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) (Gambar 4 (1)) adalah radikal bebas yang bersifat stabil dan beraktivitas dengan cara mendelokasi elektron bebas pada suatu molekul, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas yang lain. Proses delokasi ini ditunjukkan dengan adanya warna ungu (violet) pekat yang dapat dikarakterisasi pada pita absorpsi dalam pelarut etanol pada panjang gelombang 520 nm. Ketika larutan DPPH dicampurkan dengan substansi yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka dapat menimbulkan bentuk tereduksi (bentuk netral) (Gambar 4 (2)) dengan memudarnya warna ungu menjadi warna kuning (Molyneux, 2004).



Gambar 4. Formasi DPPH sebagai radikal bebas (1) dan tidak radikal (2)
(Sumber : Molyneux, 2004)

Menurut Hanani dkk. (2005), metode uji aktivitas antioksidan menggunakan radikal bebas DPPH banyak dipilih karena metode ini sederhana, mudah, cepat, peka, dan hanya memerlukan sedikit sampel. Kapasitas antioksidan pada uji ini bergantung pada struktur kimia dan antioksidan. Pengurangan radikal DPPH tergantung pada jumlah kelompok hidroksil yang ada pada antioksidan, sehingga metode ini memberikan sebuah indikasi dari ketergantungan struktural kemampuan antioksidan dari antioksidan biologis (Vattem dan Shetty, 2006).

Menurut Benabadji dkk. (2004), mekanisme reaksi yang terjadi adalah proses reduksi senyawa DPPH oleh antioksidan yang menghasilkan pengurangan intensitas warna dari larutan DPPH sehingga warna ungu dari radikal menjadi memudar (warna kuning). Senyawa DPPH (dalam metanol) berwarna ungu terdeteksi pada panjang gelombang sinar tampak sekitar 517 nm (Molyneux, 2004). Pemudaran warna akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer. Semakin pudar warna DPPH setelah direaksikan dengan antioksidan menunjukkan kapasitas antioksidan yang semakin besar pula (Benabadji dkk., 2004). Reaksi tersebut dapat digambarkan dalam persamaan berikut ini :



Gambar 5. Mekanisme Penghambatan Radikal Bebas oleh Antioksidan
(Sumber : Benabadji dkk., 2004)

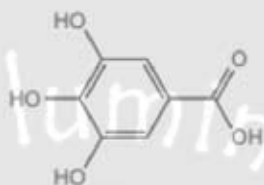
Keberadaan sebuah antioksidan dapat menyumbangkan elektron kepada DPPH, menghasilkan warna kuning yang merupakan ciri spesifik dari reaksi radikal DPPH. Senyawa yang memiliki kemampuan penangkal radikal bebas umumnya merupakan pendonor atom hidrogen (H), sehingga atom H tersebut dapat ditangkap oleh radikal DPPH untuk berubah menjadi bentuk netralnya (Kiay dkk., 2011).

I. Uji Kandungan Total Fenolik

Fenolik atau polifenol berasal dari kata poli (banyak) dan fenol (senyawa fenol) sehingga polifenol dapat dikatakan sebagai suatu senyawa yang terdiri dari banyak gugus fenol. Polifenol merupakan suatu senyawa yang terjadi dari polimerisasi fenol yang begitu kompleks dan umumnya mempunyai rantai panjang (Makfoeld, 1992). Fenolik pada tanaman memiliki banyak manfaat untuk kesehatan manusia. Salah satu golongan senyawa fenolik adalah flavonoid yang diketahui dapat menghambat pertumbuhan sel kanker dengan meningkatkan aktivitas antioksidan, anti-inflamasi, dan aktivitas vaskular (berkaitan dengan sistem sirkulasi darah) (Kim dkk., 2007).

Pengujian total fenol perlu dilakukan karena fenolik berperan atas kapasitas atau jumlah oksigen dalam kebanyakan produk dengan bahan baku tanaman. Pengujian total fenol yang umum digunakan adalah metode menggunakan reagen

Folin-Ciocalteu (FC). Reagen FC dibuat dengan campuran sodium tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodium molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), HCl, 85% asam fosforik, dan $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ yang menghasilkan larutan berwarna kuning yang jernih.



Gambar 6. Struktur Kimia Asam Galat
(Sumber : Masoud dkk., 2012)

Pembanding yang digunakan pada penelitian ini adalah asam galat yang memiliki nama kimia asam 3,4,5-trihidroksibenzoat ($\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})_3\text{COOH}$) (Gambar 5). Metode Folin-Ciocalteu untuk kuantifikasi fenolik memiliki keterbatasan yaitu tidak bereaksi secara spesifik hanya pada fenolik tetapi juga pada senyawa lain yang mudah teroksidasi seperti asam askorbat, amina aromatik, gula pereduksi, dan asam amino aromatik (van Alfen, 2014). Hasil pengukuran umumnya dinyatakan setara dengan asam galat (GAE). Asam galat digunakan karena tidak mahal, larut dalam air, mudah terkristalisasi, kering, dan stabil dalam bentuk kering (Singleton dkk., 1999).

J. Hipotesis

1. Metode ekstraksi sokletasi menghasilkan ekstrak dengan aktivitas antioksidan paling tinggi.
2. Daun sambung nyawa umur panen 4 bulan menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi dan sudah dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan alami.