

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI DAUN DAN KULIT BUAH
TIGA MACAM TANAMAN DELIMA (*Punica granatum* L.)**

Laporan Tugas Akhir

**Ria Lestari
11171042**



**Universitas Bhakti Kencana
Fakultas Farmasi
Program Strata I Farmasi
Bandung
2021**

ABSTRAK**Uji Aktivitas Antioksidan dari Daun dan Kulit Buah
Tiga Macam Tanaman Delima (*Punica granatum L.*)**

Oleh :
Ria Lestari
11171042

Delima merupakan salah satu tanaman yang banyak akan manfaat. Di Indonesia, terdapat tiga macam tanaman delima yang marak dibudidayakan yaitu delima merah, delima putih dan delima hitam. Radikal bebas diketahui terlibat dalam timbulnya berbagai penyakit. Antioksidan berperan dalam menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan sel yang disebabkan oleh radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari tiga macam tanaman delima (*Punica granatum L.*) yang dibudidayakan di Indonesia. Skrining fitokimia yang dilakukan pada semua simplisia menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, saponin, kuinon, tanin serta steroid triterpenoid yang terkandung. Sampel diekstraksi dengan cara maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang memiliki perbedaan kepolaran yaitu n-heksana, etil asetat dan metanol. Ekstrak kemudian dipantau dan diuji aktivitas antioksidannya secara kualitatif menggunakan metode kromatografi lapis tipis dan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer sinar tampak. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) diperoleh rentang nilai IC_{50} 3,62 - 419,17 $\mu\text{g/mL}$ (AAI = 8,28 - 0,07), di mana ekstrak yang paling aktif memiliki aktivitas antioksidan adalah ekstrak metanol dari daun delima hitam dengan nilai IC_{50} 3,62 $\mu\text{g/mL}$ (AAI = 8,28) dibandingkan terhadap pembanding asam askorbat dengan nilai IC_{50} 2,94 $\mu\text{g/mL}$ (AAI = 10,19). Ketiga jenis delima pada bagian kulit buah maupun daun berpotensi sebagai sumber antioksidan.

Kata kunci: antioksidan, DPPH, ekstrak, *Punica granatum*

ABSTRACT**Antioxidant Activity Assay from Leaves and Pericarpiums of
Three Kinds of Pomegranate (*Punica granatum* L.)**

By :
Ria Lestari
11171042

Pomegranate is one of the plant with most benefit. There are three kinds of pomegranate that being cultivated in Indonesia which are the red pomegranate, white pomegranate and black pomegranate. Free radicals known to be involved in several disease. Antioxidant take a role to neutrelizing free radicals and prevent further damage that caused by free radicals. The purpose of this assay is to determine the antioxidant activity from those three kinds of pomegranate (*Punica granatum* L.) that been cultivated in Indonesia. Phytochemical screening result shows that in all simplicia containing flavonoids, saponins, quinons, tannins and steroid-triterpenoids. The sample being extracted with gradient maceration method using three different solvent which are n-hexane, ethyl acetate and methanol. Thin layer chromatography used to examine the extract qualitatively, as for quantitative examination of the extract examined by spectrophotometer visible. Antioxidant activity assay with DPPH (1,1-diphenyl-picrylhydrazyl) method shows that extracts of leaves and pericarps of pomegranate has IC_{50} in range of 3,62 - 419,17 $\mu\text{g/mL}$ (AAI = 8,28 - 0,07), which the extract with strongest antioxidant activity is methanolic extract of black pomegranate's leaves with IC_{50} 3.62 $\mu\text{g/ mL}$ (AAI = 8,28) compared to ascorbic acid IC_{50} 2.94 $\mu\text{g/mL}$ (AAI = 10,19). The three kinds of pomegranates from it's leaves or pericarpium are potential to be antioxidant source.

Keywords : antioxidant, DPPH, extracts, *Punica granatum*

LEMBAR PENGESAHAN

**Uji Aktivitas Antioksidan dari Daun dan Kulit Buah
Tiga Macam Tanaman Delima (*Punica granatum L.*)**

Laporan Tugas Akhir

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan Sarjana Farmasi

**Ria Lestari
11171042**

Bandung, 20 Juni 2021

Menyetujui,

Pembimbing Utama,

Pembimbing Serta,



(Dr. apt. Dadang Juanda, M.Si.)
NIDN. 0408118401



(Kania Fajarwati, M.S.Farm)
NIDN. 0401129401

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran dan kasih sayang yang dilimpahkan oleh Allah SWT, Tuhan Yang Maha Esa, pemilik segala ilmu karena atas rahmat, karunia dan hidayah-Nya penulisan proposal penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antioksidan Dari Daun dan Kulit Buah Tiga Macam Tanaman Delima (*Punica granatum L.*)” dapat diselesaikan. Laporan tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat kelulusan Program Strata satu Farmasi Universitas Bhakti Kencana (UBK). Penulis menyadari keterbatasan pengetahuan yang dimiliki, tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak penyusunan laporan tugas akhir ini tidak akan mudah. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada seluruh pihak yang terlibat dalam proses penulisan proposal penelitian ini.

Kesempurnaan hanya milik Allah SWT, banyaknya kekurangan pada penulisan laporan tugas akhir ini tidak luput dari kelemahan dan keterbatasan penulis, oleh karena itu kritik dan saran yang bersifat membangun amat diharapkan demi perbaikan dan penyempurnaan penulisan proposal penelitian ini. Adapun penulis mengharapkan semoga laporan tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi kalangan peneliti maupun masyarakat umum dan juga civitas akademik Universitas Bhakti Kencana.

Bandung, Juni 2021

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG	viii
BAB I. PENDAHULUAN	1
I.1 Latar belakang	1
I.2 Rumusan masalah	2
I.3 Tujuan dan manfaat penelitian	2
I.4 Batasan Masalah	2
I.5 Tempat dan waktu Penelitian	2
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	3
II.1 Tinjauan Botani	3
II.2 Tinjauan Kimia.....	5
II.3 Penggunaan Tradisional	6
II.4 Tinjauan Aktivitas Farmakologi.....	6
II.5 Antioksidan	6
II.6 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan	7
II.7 Metode Pengujian DPPH	8
BAB III. METODOLOGI PENELITIAN	9
BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN	10
IV.1 Alat	10
IV.2 Bahan	10
IV.3 Penyiapan Bahan	10
IV.3 Karakterisasi Simplisia	11
IV.4 Penapisan Fitokimia	12
IV.5 Ekstraksi	13
IV.6 Pemantauan Ekstrak.....	14
IV.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan metode DPPH	14

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
V.1 Penyiapan Bahan.....	16
V.2 Karakterisasi Simplisia	17
V.3 Skrining Fitokimia	18
V.4 Ekstraksi.....	19
V.5 Pemantauan Ekstrak.....	20
V.6 Pengujian Aktivitas Antioksidan	22
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	26
VI.1 Kesimpulan.....	26
VI.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	30

DAFTAR GAMBAR DAN ILUSTRASI

Gambar II.1 Pohon delima merah (<i>Punica granatum L.</i>).....	4
Gambar II.2 Struktur Kimia Punikalin	5
Gambar V.2 Makroskopik Tanaman Delima	17
Gambar V.3 Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak.....	21
Gambar V.4 Absorbansi DPPH (λ 515 nm)	23

DAFTAR TABEL

Tabel V.1 Hasil Determinasi Tanaman	16
Tabel V.2 Hasil Karakterisasi Simplisia	18
Tabel V.3 Hasil Skrining Fitokimia Simplisia	19
Tabel V.4 Hasil Rendemen Ekstrak	20
Tabel V.5 IC ₅₀ & AAI dari Sampel Ekstrak dan Standar Asam Askorbat.....	24

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Bagan Alir Kerja.....	30
Lampiran 2 Hasil Determinasi Tanaman Delima Merah.....	31
Lampiran 3 Hasil Determinasi Tanaman Delima Putih	32
Lampiran 4 Hasil Determinasi Tanaman Delima Hitam	33
Lampiran 5 Hasil Skrining Fitokimia Simplisia.....	34
Lampiran 7 Absorbansi Kontrol DPPH.....	37
Lampiran 8 Perhitungan Nilai IC ₅₀ dan AAI Asam Askorbat	38
Lampiran 9 Perhitungan IC ₅₀ dan AAI Sampel.....	39

DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

SINGKATAN	NAMA
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPPH	<i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl</i>
IC ₅₀	<i>Inhibitory concentration</i>
AAI	<i>Antioxidant activity index</i>

BAB I. PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Radikal bebas didefinisikan sebagai molekul atau atom yang memiliki elektron valensi tak berpasangan pada orbital elektron terluarnya, bersifat tidak stabil dan sangat reaktif (Santo, *et al.*, 2016). Radikal bebas mampu mengubah lipid, protein, dan DNA secara negatif dan memicu sejumlah penyakit. Di dalam sel, interaksi superoksida berlebih dengan oksida nitrat berlebih menghasilkan peroksinitrit yang menentukan kondisi penyakit kronis seperti stroke, infark miokard, gagal jantung kronis, diabetes, syok peredaran darah, penyakit inflamasi kronis, kanker, dan penyakit neurodegeneratif lain (Maddu, 2019).

Antioksidan merupakan substansi yang mampu menunda atau mencegah oksidasi (Halliwell, 1995). Kebutuhan antioksidan dapat dipenuhi dengan cara produksi internal atau melalui konsumsi makanan (Tovar & Muriel, 2019). Beberapa antioksidan ditambahkan pada makanan atau sediaan farmasi dengan tujuan untuk memperpanjang masa simpan makanan atau sediaan tersebut. Antioksidan sintetik yang umum digunakan merupakan senyawa fenolik seperti *butylated hydroxyanisole* (BHA), *butylated hydroxytoluene* (BHT), *tert-butylhydroquinone* (TBHQ), *propyl gallate* (PG) dan *octyl gallate* (OG) (Gulcin, 2020). Adapun dilaporkan BHA, TBHQ dan PG memiliki potensi untuk membentuk kompleks molekuler dengan struktur asam nukleat dan menyebabkan kerusakan pada struktur heliks ganda DNA (Dolatabadi & Kashanian, 2010).

Kemungkinan toksisitas dari antioksidan sintetik menjadikan antioksidan alami banyak diteliti dengan tujuan pencarian alternatif dari antioksidan sintetik. Salah satu tanaman yang marak diteliti karena diduga mengandung antioksidan tinggi adalah delima. Di Indonesia, ada tiga jenis delima yang dibudidayakan, diantaranya adalah delima putih, delima merah dan delima hitam. Masyarakat di Indonesia secara tradisional biasanya memanfaatkan kulit buah delima putih untuk mengatasi keputihan pada wanita dan mencegah kenaikan kolesterol darah sedangkan bagian daun delima putih digunakan untuk membantu meredakan demam, sakit perut dan obat luka ringan (Fitria *et al.*, 2018) Kulit buah delima merah banyak digunakan oleh masyarakat untuk meringankan diare (Yunus, Nge, & Sabuna, 2018).

Dari tiga jenis delima yang dibudidayakan di Indonesia, diketahui kulit buah delima merah memiliki efektivitas dalam menghambat peningkatan jumlah melanin, memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Vibrio cholera* dan antioksidan (Elif & Türkog, 2016;

Siahaan *et al.*, 2017; Yunus *et al.*, 2018) sehingga delima jenis lain juga berpotensi untuk memiliki aktivitas farmakologi serupa. Penelitian ini bertujuan untuk meninjau potensi daun dan kulit buah delima sebagai antioksidan, dan diharapkan dapat menjadi pertimbangan untuk penelitian lebih lanjut terkait antioksidan maupun tiga jenis buah delima yang dibudidayakan di Indonesia.

I.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, dapat diajukan suatu rumusan masalah sebagai berikut:

- Apakah ekstrak daun dan ekstrak kulit buah delima memiliki aktivitas antioksidan?
- Ekstrak mana yang memiliki aktivitas antioksidan paling kuat?

I.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan dari daun dan kulit buah tiga jenis delima yang dibudidayakan di Indonesia diantaranya delima putih, delima merah dan delima hitam. Penelitian ini juga bertujuan untuk menemukan sumber antioksidan alternatif.

I.4 Batasan Masalah

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun dan kulit buah delima merah, delima putih dan delima hitam dengan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH).

I.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Farmakognosi—Fitokimia Universitas Bhakti Kencana, pada periode bulan Februari hingga Mei 2021.

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Tinjauan Botani

Tinjauan botani akan memuat paparan yang mencakup klasifikasi, nama lain, morfologi, ekologi dan budidaya tanaman delima (*Punica granatum* L.)

II.1.1 Klasifikasi

Tanaman delima diklasifikasikan sebagai berikut

Kingdom : Plantae
Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Myrtales
Famili : Lythraceae
Genus : *Punica*
Spesies : *Punica granatum*

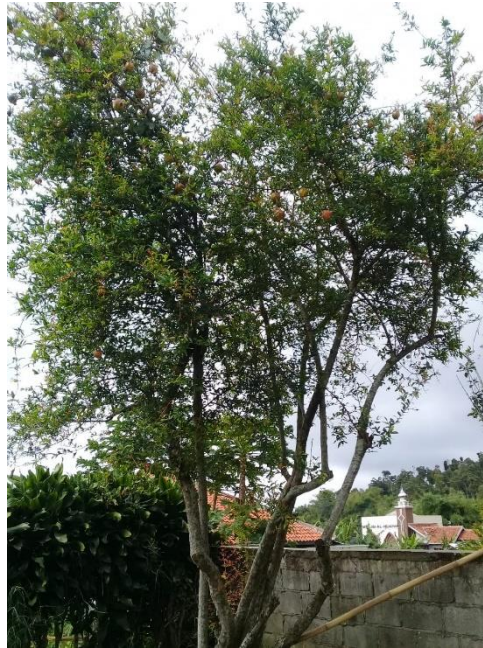
(Cronquist & Takhtajan, 1981)

II.1.2 Nama Lain

Delima merupakan nama umum yang digunakan di Indonesia, dalam bahasa Inggris delima disebut dengan *pomegranate*. Pada wilayah-wilayah tertentu di Indonesia, delima memiliki sebutan lain, di Aceh, delima disebut dengan glima, masyarakat Sumatera Utara menyebut dalimo, masyarakat Timor menyebut lekokase, masyarakat Jawa Tengah menyebut dlina, masyarakat Jawa Barat menyebutnya dengan dalima, masyarakat Roti menyebutnya dengan dila daelak, dan masyarakat Bima menyebutnya dengan talima (Baihaqi *et al.*, 2017).

II.1.3 Morfologi

Tanaman delima dideskripsikan berupa pohon kecil atau semak dengan ranting yang berbentuk segi empat dan seringkali berduri. Tinggi dari tanaman ini mencapai 5 hingga 10 meter. Varietas kerdil (*P. granatum* var. *nana*) dan varietas semak merambat tumbuh tidak lebih dari 2 meter. Daun tunggal, berhadapan (bersilang) pada lingkaran ranting (buku) yang sama, atau tertata sehingga tampak seperti bersilang. Daun terkadang berhimpitan hampir rapat di ujung ranting, berbentuk lonjong (*oblong*), lanset (*lanceolate*) atau *obovate* dengan panjang hingga 7,5 cm, lebar 0,5-2,5 cm dengan pertulangan daun menyirip dan permukaan atas mengkilat.



Gambar II.1 Pohon delima merah (*Punica granatum L.*)

Warna bunga delima berkisar kuning pucat hingga merah tua tergantung dari jenis buah delima, delima putih memiliki bunga dengan warna kuning pucat, delima merah memiliki bunga dengan warna merah terang sedangkan bunga delima hitam memiliki warna merah tua cenderung ungu. Ukuran bunga dapat mencapai 2,5 cm, terletak pada ujung batang dan ketiak daun, tunggal atau dalam kelompok mengakhiri cabang ketiak, teratur, perhiasan bunga dan benang sari terletak di atas putik (*epigynous*), daun kelopak (*cephals*) berjumlah 5-8, kelopak bunga biasanya hampir sebanyak jumlah dari daun kelopak, tumpang tindih dan kusut di bagian kuncup. Bagian buah delima memiliki kulit dengan permukaan kasar, dimahkotai oleh sepal yang persisten. Diameter sekitar 3,5 hingga 12,5 cm.

Warna kulit buah berkisar dari kuning hingga ungu kehitaman, tetapi warna delima pada umumnya adalah merah jambu hingga merah. Di Indonesia delima dengan kulit buah berwarna putih, merah dan kehitaman banyak dibudidayakan. Warna kulit biji juga bisa bervariasi dari merah ke putih, bagian dalam terbagi oleh dinding membran dan jaringan spon putih menjadi kantung-kantung yang berisi biji yang terbalut dalam masa empuk berair (Cronquist & Takhtajan, 1981).

II.1.4 Ekologi dan Budidaya

Delima berasal dari timur tengah yang mencakup daerah Iran dan Afganistan (Balitbangtan, 2020). Delima secara luas didistribusikan di banyak daerah tropis dan subtropis (Drini et al., 2020). Berbagai tipe tanah dapat digunakan sebagai media tumbuh delima kecuali pada tanah

salin atau tanah-tanah yang memiliki pH terlalu tinggi. Untuk perkembangan akar yang optimal hendaknya tanaman delima dibudidaya pada tanah dengan drainase baik dan tidak terlalu padat. Perbanyakan delima dapat dilakukan melalui penanaman biji, pemisahan anakan maupun pembiakan vegetatif seperti setek batang dan cangkok. Hasil perbanyakan ini kemudian dipelihara dalam wadah tunggal atau polybag sebelum ditanam di lahan selama 2-3 bulan (Balitbangtan, 2020).

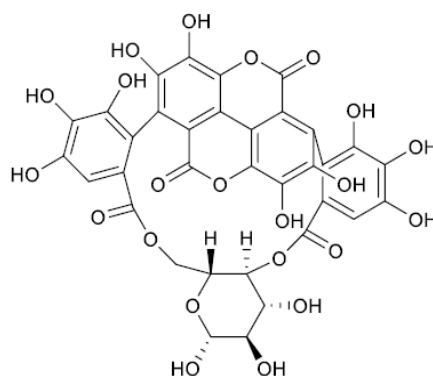
II.2 Tinjauan Kimia

Buah delima merah memiliki kadar senyawa polifenol yang tinggi, seperti isomer punikalin, derivat asam elagat dan antosianin (*delphinidin, cyanidin, pelargonidin 3-glucosides, and 3,5-diglucosides*). Sedangkan pada kulit buah merah didominasi oleh tanin terhidrolisis. Kandungan senyawa kimia lain yang terdapat pada kulit buah delima diantaranya asam hidroksinat, dan asam hidroksibenzoat (Ismail *et al.*, 2019).

Daun delima mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, quinon, steroid/triterpenoid (Yuniarto *et al.*, 2018). Secara keseluruhan baik buah maupun pada komponen pohon delima mengandung senyawa fitokimia seperti asam askorbat, asam galat, asam kafeat, asam klorogenik, katekin, epikatekin, epigallokatekin, *3-gallate*, kuersetin, kaempferol, rutin, apigenin, naringin, punikalin, dan melatonin (Dassprakash *et al.*, 2012).

II.2.1 Punikalin

Punikalin merupakan senyawa identitas dari jenis ellagitanin yang ada di kulit buah delima (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia, 2017). Punikalin yang diisolasi dari kulit buah delima diketahui secara *in vitro* maupun *in vivo* memiliki aktifitas antioksidan kuat (Yu-qing *et al.*, 2017).



Gambar II.2 Struktur Kimia Punikalin

Sumber : Farmakope Herbal Indonesia edisi II tahun 2017

Punikalin telah dilaporkan memiliki potensi aktivitas sebagai anti-hepatotoksik, antibakteri, antikanker dan anti replikasi HIV (Akiyama *et al.*, 2001; Heber, 2008; Lin *et al.*, 2001; Martino *et al.*, 2004).

II.3 Penggunaan Tradisional

Daun delima putih secara empiris digunakan untuk membantu meredakan demam, sakit perut dan obat luka ringan. Daun delima merah digunakan untuk ramuan pereda batuk dan pilek, gatal berupa ruam pada kulit dan terkadang digunakan sebagai ramuan untuk mengatasi jerawat. Kulit buah delima merah banyak digunakan oleh masyarakat untuk merawat kesehatan kulit dan membantu untuk meringankan diare (Yunus *et al.*, 2018). Kulit buah delima putih digunakan untuk mengatasi keputihan pada wanita dan mencegah kenaikan kolesterol darah (Fitria *et al.*, 2018).

II.4 Tinjauan Aktivitas Farmakologi

Aktivitas farmakologi yang telah diuji dari kulit buah delima diantaranya sebagai *leishmanicidal* dengan menghambat proliferasi parasit *Leishmania infantum* (Imperatori *et al.*, 2018), antiinfeksi parasit *Giardia lamblia* (Al-megrin, 2016), antiinflamasi topikal (Houston *et al.*, 2017), anticacing *Ascaridia galli* (Abdel *et al.*, 2018) dan antioksidan. Kulit buah delima merah diketahui memiliki efektivitas dalam menghambat peningkatan jumlah melanin (Siahaan *et al.*, 2017) dan antibakteri *Vibrio cholera* (Yunus *et al.*, 2018). Daun delima diketahui memiliki aktivitas sebagai antiobesitas (Yuniarto *et al.*, 2018), antidiabetes (Cheurfa *et al.*, 2020), antioksidan (Derakhshan *et al.*, 2018), dan menginduksi apoptosis untuk menghambat migrasi dan invasi pada kanker paru-paru secara *in vitro* (Deng *et al.*, 2017).

II.5 Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai substansi yang mampu menunda atau mencegah oksidasi (Halliwell, 1995). Kemampuan antioksidan dalam mengatasi radikal bebas bukan hanya berefek untuk meningkatkan umur simpan makanan dan sediaan farmasi yang sering kali rusak pada saat proses penyimpanan dan produksi akibat peroksidasi lipid, namun dapat juga melindungi tubuh manusia dari radikal bebas yang dapat mengganggu kesehatan (Gulcin, 2020).

Antioksidan dapat menghambat atau memperlambat oksidasi melalui dua cara, salah satunya dengan menangkap radikal bebas, dengan mekanisme ini suatu senyawa digambarkan sebagai

antioksidan primer, contohnya seperti alfa-tokoferol (Altay et al., 2019). Antioksidan sekunder bekerja melalui mekanisme yang lain dengan tidak melibatkan radikal bebas secara langsung seperti pengikatan ion logam, menangkap spesies oksigen reaktif, mengubah hidroperoksida menjadi spesies non-radikal, menyerap radiasi UV atau menonaktifkan oksigen singlet. Antioksidan sekunder biasanya hanya menunjukkan aktivitas ketika adanya komponen minor kedua (Gulcin, 2020).

II.6 Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan

Metode yang telah dilakukan untuk meninjau aktivitas antioksidan memiliki prinsip pengujian yang berbeda-beda. Metode pengujian seperti metode thiosianat, metode *phosphomolybdenum* dan uji pemutihan beta-karoten berdasarkan pada prinsip *Total Antioxidant Capacity*, metode-metode ini menguji kemampuan suatu senyawa dalam menghambat degradasi oksidatif seperti peroksidasi lipid (Roginsky & Lissi, 2005). Pengujian lainnya adalah dengan *Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC assay)* atau mengukur kemampuan antioksidan dalam memutuskan rantai radikal dengan memantau penghambatan oksidasi yang diinduksi oleh ROO (Miller et al., 1993; Whitehead et al., 1992).

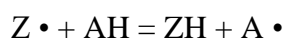
Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP assay) menguji aktivitas antioksidan berdasarkan perlindungan yang diberikan antioksidan pada peluruhan fluoresensi *R-phycoerythrin* selama reaksi peroksidasi terkontrol. Uji *chemiluminescent* berdasarkan pada kompetisi antara antioksidan dan luminol (reagen) untuk H_2O_2 , keberadaan antioksidan ditandai dengan berkurangnya intensitas emisi cahaya. Metode *Ferric reducing antioxidant power (FRAP)*, *Cupric ions (Cu^{2+}) reducing antioxidant power (CUPRAC)* dan *Ferric ion (Fe^{3+}) reducing antioxidant power ($Fe^{3+}-Fe^{2+}$ transformation assay)* berdasarkan pada *reducing antioxidant power*, dimana kenaikan absorbansi mengindikasikan kenaikan aktivitas antioksidan (Gulcin, 2020).

Metode DPPH, ABTS+, dan DMPD termasuk pada *radical scavenging assays*, metode ini berdasarkan pada derajat dekolorisasi yang terjadi ketika antioksidan ditambahkan pada radikal. Metode pengujian yang lain adalah metode *Thiobarbituric Acid Value* yang biasanya digunakan untuk memantau peroksidasi lipid. Metode ini didasarkan atas reaksi TBA (Asam Tiobarbiturat) dengan MDA (*Malondialdehyde*) yang merupakan produk dari reaksi degradasi lipid tak jenuh dengan TBA dalam suasana asam (Gulcin, 2020). Antioksidan juga dapat diuji dengan metode uji secara enzimatis, salah satu contohnya merupakan aktivitas SOD

(*Superoxide Dismutase*) dengan mengukur kemampuan inhibisi dari reaksi *nitroblue tetrazolium chloride* (Sahoo *et al.*, 2020)

II.7 Metode Pengujian DPPH

DPPH dicirikan sebagai radikal bebas yang stabil berdasarkan delokalisasi elektron bebas pada keseluruhan molekul sehingga molekul tidak akan membentuk dimer seperti kebanyakan radikal bebas. Delokalisasi yang terjadi akan menimbulkan warna ungu tua yang ditandai dengan pita absorbansi dalam larutan etanol pada panjang gelombang sekitar 520 nm. Ketika larutan DPPH dicampurkan dengan substansi yang dapat mendonorkan atom hidrogen, maka akan dihasilkan bentuk tereduksi dari DPPH yang ditandai dengan hilangnya warna ungu. Reaksi utama yang terjadi digambarkan sebagai berikut, dengan Z • sebagai radikal DPPH dan AH sebagai molekul donor:



Dimana ZH merupakan bentuk tereduksi dari DPPH sedangkan A • adalah radikal bebas yang diproduksi pada tahap pertama. Radikal terakhir ini kemudian akan mengalami reaksi lebih lanjut yang mengontrol stoikiometri secara keseluruhan, yaitu berkurangnya jumlah molekul DPPH (Molyneux, 2004). Ketika antioksidan dicampurkan dengan larutan radikal DPPH, antioksidan akan mendonorkan atom hidrogen, maka akan muncul bentuk tereduksi yang ditandai dengan hilangnya warna ungu (Alam *et al.*, 2013).

BAB III. METODOLOGI PENELITIAN

Metodologi yang digunakan meliputi penyiapan bahan, karakterisasi simplisia, penapisan fitokimia, ekstraksi, pemantauan ekstrak dan pengujian aktifitas antioksidan.

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan, determinasi tanaman, dan pengolahan bahan hingga diperoleh simplisia. Karakterisasi simplisia mencakup penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut etanol dan penetapan kadar sari larut air. Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan golongan alkaloid, saponin, kuinon, tanin dan steroid/triterpenoid.

Ekstraksi simplisia daun dan kulit buah delima dilakukan dengan cara maserasi gradien menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan metanol. Ekstrak cair yang didapat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Pemantauan ekstrak dilakukan dengan kromatografi lapis tipis dengan fase diam silika gel F₂₅₄ pra salut dan fase gerak yang sesuai.

Pengujian aktivitas antioksidan dari ekstrak daun dan kulit buah delima dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH).