

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.).

2.1.1 Klasifikasi Tanaman Buah Kakao

Menurut Susilo (2015) berikut ini taksonomi sistematika tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.):

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Subkelas	: Dialypetalae
Ordo	: Malvales
Famili	: Sterculiaceae
Genus	: <i>Theobroma</i>
Spesies	: <i>Theobroma cacao</i> Linnaeus



Gambar 2. 1 Tanaman buah kakao (*Theobroma Cacao* L.) (Susilo, 2015)

2.1.2 Deskripsi Tanaman Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.)

Tanaman kakao merupakan tanaman tahunan yang berasal dari Amerika Selatan yang dibudidayakan pada daerah tropis. Kakao mulai di perkenalkan ke Indonesia oleh bangsa Spanyol di Minahasa, Sulawesi Utara pada tahun 1560. Kakao merupakan tanaman perkebunan yang dibudidayakan oleh masyarakat Indonesia baik skala kecil maupun skala besar. Kakao yang memiliki nama latin (*Theobroma cacao* L.) ini tumbuh di daerah dengan ketinggian 0-500 mdpl dan dapat tumbuh di daerah dengan ketinggian mencapai 800 mdpl. Tanaman kakao menghasilkan produksi maksimal pada usia 5-13 tahun, produksi dalam satu tahun mencapai 1000 kg/ha biji kakao kering (Sutomo, dkk., 2018). Karakteristik morfologi Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) yang dapat diamati meliputi batang, daun, bunga, buah, dan biji (Kurniawati, dkk., 2016). Secara umum, tanaman ini dapat dibagi menjadi dua komponen, yaitu bagian vegetatif yang terdiri dari akar, batang, dan daun serta bagian generatif yang meliputi bunga dan buah

2.1.3 Daun

Daun kakao terdiri dari tangkai daun dan helai daun. Panjang daun berkisar 25-34 cm dan lebarnya 9-12 cm. Daun yang tumbuh pada ujung-ujung tunas biasanya berwarna merah dengan permukaannya seperti sutera. Setelah dewasa, warna daun akan berubah menjadi hijau dan permukaannya akan berubah menjadi kasar. Daun tanaman kakao merupakan daun tunggal, yang setiap tangkai daun hanya memiliki satu helai daun. Bentuk helai daun berupa bulat memanjang (*oblongus*), ujung daun meruncing (*acuminatus*), dan pangkal daun runcing (*acutus*), sedangkan tangkai daunnya berbentuk

silinder, memiliki sisik halus, permukaan daun licin dan mengkilap (Risdayanti, R. 2024).

2.1.4 Kandungan Kimia

Skrining fitokimia daun kakao mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, asam fenolat, theobromine dan tanin (Putri, dkk., 2024). Daun kakao mengandung polifenol dengan jumlah dari masing-masing jenis senyawa polifenol yang dipengaruhi oleh umur daun, daun muda mengandung total polifenol 19,0% sedangkan daun tua mengandung total polifenol 28,4%. Selain itu ekstrak daun kakao juga memiliki metabolit sekunder saponin dan tanin (Hasanah, 2016).

2.1.5 Bioaktivitas Tanaman Kakao

Tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.) kaya akan metabolit sekunder yang menunjukkan beragam bioaktivitas. Di antaranya, flavonoid memiliki aktivitas antibakteri (Putri, dkk., 2024). Senyawa flavonoid seperti katekin dan epikatekin diketahui memiliki efek anti-inflamasi (Tušek., dkk., 2024), sementara polifenol dalam kakao berkontribusi pada aktivitas antioksidan dan anti-penuaan yang esensial untuk pemeliharaan kesehatan kulit (Scapagnini., dkk., 2014)

2.2 Ekstraksi

Salah satu cara untuk mendapatkan manfaat dari kandungan bahan alam adalah dengan mengambil atau memisahkan kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Cara yang paling umum digunakan untuk mendapatkan kandungan senyawa aktif pada suatu tanaman biasanya dilakukan dengan teknik ekstraksi.

Ekstraksi adalah pemisahan antara zat yang diinginkan dengan zat yang tidak diinginkan dari simplisia tumbuhan dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan zat akan dipisahkan. Proses ekstraksi akan berhenti ketika kesetimbangan telah tercapai antara konsentrasi senyawa simplisia dan konsentrasi senyawa dalam pelarut (Sudarwati dan Sumarni 2016).

2.2.1 Metode Ekstraksi

Ada beberapa metode ekstraksi konvensional seperti maserasi, soxhletasi, perkolasi, refluks, shoxlet, infusa dan dekokta (Damayanti, dkk., 2021).

1. Ekstraksi Cara Dingin

a. Maserasi

Maserasi merupakan salah satu cara untuk memisahkan senyawa dengan merendam bahan menggunakan pelarut organik pada suhu tertentu (Karina, dkk. 2016). Saat proses merendam berlangsung, dinding sel dan membran sel akan terpecah karena terdapat perbedaan tekanan antara luar dan dalam sel, sehingga metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlepas dan larut dalam pelarut organik yang digunakan, serta prosedur yang digunakan sederhana, menggunakan pemanasan dengan suhu rendah serta biaya yang rendah sehingga dapat digunakan pada senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Novitasari dan Putri, 2016).

b. Perkolasi

Metode ekstraksi perkolasi menarik metabolit menggunakan pelarut yang terus diisi secara berkelanjutan. Dengan adanya penambahan filtrat secara

terus menerus, diharapkan dapat diperoleh ekstrak yang lebih sempurna dan meningkatkan jumlah ekstrak yang dihasilkan karena waktu kesetimbangan yang lebih lama (Verawati, dkk., 2017). Keuntungan dari metode ekstraksi perkolasi adalah senyawa yang diperoleh lebih banyak karena proses dilakukan dengan mengalirkan pelarut terus-menerus dalam waktu yang relatif singkat, sehingga mampu melindungi senyawa yang tidak tahan terhadap panas. Namun, kekurangan metode ini adalah menggunakan lebih banyak cairan penyari dan memiliki risiko kontaminasi mikroba karena dilakukan secara terbuka.

2. Ekstraksi Cara Panas

a. Refluks

Refluks merupakan ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin umpan balik (Hasrianti, 2016). Kelebihan dari metode refluks adalah digunakan mengekstraksi sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung.

b. Soxhlet

Ekstraksi menggunakan Soxhlet merupakan salah satu metode yang paling baik digunakan dalam memisahkan senyawa bioaktif dari alam. Metode ekstraksi soxhletasi memiliki beberapa kelebihan dibanding metode ekstraksi lain yaitu sampel kontak dengan pelarut yang murni secara

berulang, kemampuan mengekstraksi sampel lebih tanpa tergantung jumlah pelarut yang banyak (Anam, dkk., 2014).

c. Infusa

Infusa merupakan proses ekstraksi yang umumnya digunakan untuk mengekstrak kandungan zat aktif dengan pelarut air dari bahan-bahan nabati pada suhu 90°C selama 15 menit. Keuntungan pemilihan metode infusa adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana (Nur, dkk. 2020). Metode infusa dengan pemanasan ini terkadang dapat merusak kandungan kimia dari sampel bahan alam yang digunakan (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2014).

d. Dekokta

Dekokta merupakan cara mengambil zat aktif dari tanaman dengan merebus simplisia dalam air sampai volumenya berkurang. Teknik ini digunakan untuk mengekstraksi bahan keras seperti biji, akar, dan kulit batang yang tidak mengandung senyawa aromatik yang mudah menguap (Sari dan Meitisa, 2017). Dekokta mirip dengan infusa, tetapi penyaringannya dilakukan dalam kondisi panas dan menggunakan wadah yang terbuka (Atun, 2014).

2.3 Kosmetik

2.3.1 Pengertian Kosmetik

Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD & C Act) menjelaskan apa yang dimaksud dengan kosmetik berdasarkan tujuan penggunaannya. Kosmetik adalah bahan

atau sediaan yang digunakan di bagian luar tubuh, seperti digosok, dituang, ditaburi, atau disemprotkan ke tubuh manusia, dengan tujuan untuk membersihkan, mempercantik, mempromosikan daya tarik, atau mengubah penampilan. Kosmetik tidak digunakan untuk mengobati atau memperbaiki kondisi tubuh, serta tidak membuat klaim bahwa produk tersebut adalah obat (Medicine, 2020).

2.3.2 Penggolongan kosmetik

Penggolongan Kosmetika menurut Peraturan Menteri Kesehatan RI berdasarkan kegunaan dan lokalisasi pemakaian pada tubuh:

- a) Sediaan bayi: minyak *baby*, bedak *baby*, dan lain-lain.
- b) Sediaan mandi: sabun mandi, bath capsule, dan lain-lain.
- c) Sediaan mata: maskara, *aye-shadow*, dan lain-lain.
- d) Sediaan wangi-wangian: pewangi badan, parfum, dan lain-lain.
- e) Sediaan rambut: kondisioner, *hair tonic*, *Hair Serum*, *hair spray*, dan lain-lain.
- f) Sediaan make-up: bedak, lipstick, dan lain-lain
- g) Sediaan hygiene mulut: pasta gigi, *mouth washes* dan penyegar mulut
- h) Sediaan kuku: nail dryer dan pewarna kuku.
- i) Sediaan kulit: pelembab, pembersih, dan lain-lain

(Sari., 2019)

2.4 Serum

Serum adalah produk yang memiliki konsentrasi zat aktif yang tinggi, sehingga mampu masuk ke dalam kulit untuk memberikan manfaat. Serum memiliki tekstur yang ringan dan mudah menempel di permukaan kulit dengan membentuk lapisan tipis.

Serum memiliki salah satu keunggulan yaitu konsentrasi bahan aktif yang tinggi sehingga lebih cepat terserap ke dalam kulit, memberikan rasa nyaman dan lebih mudah menyebar di permukaan kulit (Ojha, dkk., 2019).

2.4.1 Jenis-jenis Serum

Beberapa jenis dan fungsi serum adalah sebagai berikut: (Mulyawan, 2013.)

1. Serum *Anti Acne*

Serum ini dirancang untuk mengatasi masalah kulit berjerawat, dengan kandungan bahan yang dapat mengeringkan jerawat dan mengurangi produksi minyak berlebih pada wajah. Meskipun serum ini efektif untuk meredakan jerawat, berbeda dengan obat jerawat lainnya, serum anti-acne tetap menjaga kelembapan kulit.

2. Serum *Whitening*

Serum ini mengandung bahan yang berfungsi untuk mencerahkan kulit wajah. Penggunaan yang rutin, disertai dengan perlindungan dari sinar matahari (*sunblock*), dapat memberikan hasil yang maksimal.

3. Serum *Anti-aging*

Serum ini mengandung kolagen dan bahan-bahan yang membantu mencegah munculnya kerutan dan garis halus pada wajah. Penggunaan serum *anti-aging* disarankan mulai usia 30 tahun untuk menjaga penampilan kulit wajah tetap muda.

4. Serum Vitamin C

Vitamin C atau asam askorbat adalah antioksidan yang dapat melindungi kulit dari dampak buruk polusi dan bahan berbahaya lainnya. Penggunaan serum yang mengandung vitamin C dapat membantu merawat kesehatan kulit.

5. Serum Vitamin E

Vitamin E berfungsi untuk mengembalikan kelembapan kulit, serta bertindak sebagai antioksidan yang dapat mencegah penuaan dini.

2.4.2 Serum Rambut

Hair serum merupakan sediaan kosmetik berbentuk cair hingga semi padat yang diformulasikan mengandung berbagai bahan aktif, seperti vitamin, antioksidan, humektan dan senyawa bioaktif lainnya yang berfungsi untuk melindungi, memperbaiki, serta menutrisi rambut dan kulit kepala. Sediaan ini digunakan untuk membantu mengatasi berbagai permasalahan rambut, seperti rambut kering, rusak, bercabang, dan kusam. Serum rambut memiliki konsentrasi bahan aktif yang relatif lebih tinggi dibandingkan sediaan perawatan rambut lainnya sehingga mampu memberikan efek perawatan yang lebih optimal pada batang rambut maupun kulit kepala. Selain itu, produk ini membantu menjaga rambut tetap lembap dan melindungi rambut dari berbagai faktor seperti kontaminan, alat styling, dan sinar UV (Vakhariya, dkk., 2022).

2.4.3 Komposisi Sediaan Serum Rambut

1. Tween 80

Berfungsi sebagai Surfaktan. Tween 80 berbentuk cairan berminyak yang berwarna kuning. Tween larut dalam etanol dan air, umumnya bahan ini bersifat tidak toksik dan tidak mengiritasi. (Safitri, dkk. 2022).

2. Gliserin

Gliserin berfungsi sebagai humektan digunakan untuk mengontrol kadar air dalam sediaan, gliserin dapat meningkatkan kelarutan dari ekstrak yang tidak dapat larut sehingga mampu terlarut secara sempurna di dalam air (Hendradi, dkk. 2013).

3. Methylparaben

Methylparaben merupakan ester asam-parahidroksibenzoat yang digunakan sebagai bahan anti-bakteri dalam produk kosmetik untuk mencegah pertumbuhan bakteri yang dapat mengotori produk tersebut (Rasyid, dkk., 2017).

4. Aquadest

Aquades atau yang sering disebut aqua destilasi merupakan air murni yang dihasilkan dari proses destilasi dimana didalamnya hampir tidak mengandung mineral (Wahyudi, dkk., 2017).

2.4.4 Evaluasi Sediaan Serum Rambut

1. Uji Organoleptik

Uji organoleptik adalah cara untuk memeriksa sifat fisik dan kimia suatu bahan dengan menggunakan indra manusia seperti penglihatan, penciuman, perasa, pendengaran, dan sentuhan (Rangkuti, dkk., 2024).

2. Uji Homogenitas

Uji homogenitas adalah salah satu hal penting karena digunakan untuk mengetahui apakah bahan aktif sudah tersuspensi secara merata di dalam bahan dasar atau belum. Tujuan dari uji ini adalah untuk memastikan semua bahan yang digunakan telah tercampur secara rata (Ambari, dkk., 2021).

3. Uji pH

Pengecekan nilai pH merupakan hal penting yang perlu diperhatikan dalam pembuatan formulasi sediaan topikal. Uji pH bertujuan untuk mengetahui apakah nilai pH dari suatu sediaan cocok untuk digunakan pada kulit. Nilai pH yang direkomendasikan untuk sediaan topikal adalah antara 4,5 hingga 6,5. Jika nilai pH terlalu asam, dapat menyebabkan kulit mengalami iritasi, sedangkan jika terlalu basa, kulit bisa menjadi bersisik (Titaley, dkk., 2014).

4. Uji Viskositas

Uji viskositas berguna untuk mengetahui seberapa besar kekentalan suatu sediaan, di mana nilai viskositas atau kekentalan tersebut menunjukkan seberapa besar tahanan suatu cairan untuk mengalir (Anggun dan Pambudi, 2020).

5. Uji Stabilitas

Uji stabilitas fisik dilakukan untuk menjamin sediaan memiliki sifat yang sama setelah sediaan dibuat dan masih memenuhi parameter kriteria selama penyimpanan. Uji stabilitas pada suhu tinggi dilakukan pada suhu $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 8 minggu (Sayuti, 2015).

2.5 Rambut

Rambut adalah bagian tubuh yang memiliki makna besar secara psikologis dan sosial. Rambut merupakan sel berserabut yang mengandung protein keratin, dan terdapat hampir di seluruh tubuh manusia, kecuali di telapak tangan dan kaki. Pertumbuhan rambut di kepala yang normal dan sehat biasanya mencapai sekitar 0,5 inci setiap bulannya. Rambut sering disebut sebagai mahkota bagi wanita maupun pria yang peduli dengan estetika dan penampilan mereka. Rambut terbagi menjadi 2 bagian, yaitu: batang rambut dan akar rambut (Indrawati, 2024).

1. Batang Rambut

Batang rambut merupakan bagian rambut yang berada di luar kulit berupa benang halus terdiri dari keratin atau sel-sel tanduk. Batang rambut tersusun oleh Medulla, bagian yang paling tengah. Paling dalam adalah cortex, lapisan yang menyelimuti medulla. Lapisan ini paling tebal adalah cuticula yang merupakan lapisan yang terdapat paling luar.

- Cuticula atau kulit ari adalah lapisan terluar dari rambut yang terdiri dari sel-sel tanduk yang berbentuk pipih dan rata. Sel-sel ini tersusun seperti sisik ikan. Bagian bawahnya menutupi bagian di atasnya.

- Lapisan kedua adalah korteks atau kulit rambut. Lapisan ini terdiri dari kumpulan benang halus yang terbuat dari keratin atau sel tanduk yang tersusun secara memanjang, serta mengandung melanin. Setiap helai benang halus disebut fibril. Fibril terbentuk dari molekul yang memiliki butiran pigmen melanin. Granul pigmen yang terdapat di dalam korteks akan memberikan warna pada rambut. Pigmen rambut terdapat di dalam korteks.
- Medula atau sumsum Rambut terletak pada lapisan paling dalam dari batang rambut yang terdiri dari zat yang tersusun sangat renggang yang membentuk jala, sehingga terdapat rongga yang berisi udara.

2. Akar Rambut

Akar rambut adalah bagian rambut yang berada di dalam kulit dan tertanam di dalam folikel atau kantung rambut. Bagian rambut yang tertanam atau berada di dalam kulit sebagian. Akar rambut tertanam secara miring di dalam lapisan dermis.

- Folikel atau kantong rambut adalah bentuk penjuruan seperti silinder yang terdiri dari dua lapis. Lapisan dalam berasal dari sel-sel kulit luar, sedangkan lapisan luar berasal dari sel-sel corium. Folikel rambut yang sudah dewasa dililiti oleh lapisan kulit luar yang tumbuh ke dalam, mengelilingi dan berhenti di sekitar bagian paling dalam yaitu umbi folikel.
- Papil rambut adalah bagian paling bawah dari folikel rambut. Di dalam papil rambut terdapat sel-sel yang disebut melanosit, yang mampu menghasilkan pigmen. Pigmen ini kemudian disebarkan ke dalam bagian cortex dan medulla

rambut. Di dalam papil rambut juga terdapat pembuluh darah, getah bening, serta serabut saraf yang mengatur serta mempersarafi folikel rambut.

- Tunas rambut adalah bagian paling bawah dari rambut yang berada di dekat papil. Bentuknya agak melengkung. Di bagian ini terdapat sel-sel rambut yang masih hidup, yang terus membelah diri karena dekat dengan pembuluh papil yang mengeluarkan cairan yang berisi makanan.

2.5.1 Siklus Pertumbuhan Rambut

Folikel rambut tidak aktif terus-menerus seumur hidupnya. Pada waktu-waktu tertentu folikel rambut akan mengalami masa peralihan dan masa istirahat. Masa kehidupan folikel rambut dapat dibedakan menjadi empat fase (Indrawati, 2024).

1. Fase pertumbuhan (Anagen).

Fase anagen adalah fase pertumbuhan aktif, dimana folikel rambut akan membesar mencapai karakteristiknya yaitu berbentuk umbi dan terdapat serat rambut.

2. Fase peralihan (Katagen)

Fase peralihan atau katagen dimulai ketika fase pertumbuhan berakhir. Pada awal fase ini, proses diferensiasi dan pertumbuhan sel-sel rambut di sekitar folikel mulai berkurang, aktivitas produksi pigmen oleh melanosit berhenti, serta produksi batang rambut juga berhenti.

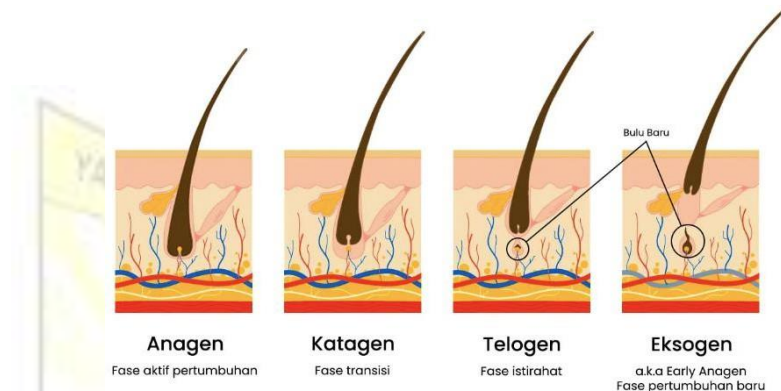
3. Fase istirahat (Telogen).

Berlangsung $\pm$ 4 bulan, rambut mengalami kerontokan 50 ± 100 lembar rambut rontok dalam tiap harinya. Rambut dalam fase telogen berkisar 10-15%.

Pelepasan rambut yang mati terjadi pada fase telogen akhir atau awal anagen.

4. Fase peralihan (Eksogen)

Pada fase ini, rambut akan lepas atau rontok merupakan hal yang normal. Beberapa minggu kemudian, folikel rambut kembali memasuki fase pertumbuhan (anagen) dan mengulangi lagi siklus pertumbuhan rambut.



Gambar 2. 2 Siklus Pertumbuhan Rambut (Indrawati, 2024)

2.6 Antioksidan

Senyawa yang berperan dalam menangkap radikal bebas disebut sebagai antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang memberikan elektron tunggal atau atom hidrogen untuk memperbaiki radikal bebas. Menurut Rabeta dan Faraniza (2013), antioksidan juga dijelaskan sebagai senyawa atau komponen kimia yang dalam jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi. Secara kimia, senyawa antioksidan termasuk dalam kategori senyawa pemberi elektron atau disebut sebagai donor elektron. Sumber antioksidan alami dapat diperoleh dari tanaman yang dipercaya memiliki kandungan senyawa yang tinggi akan antioksidan, salah satunya tanaman kakao (*Theobroma cacao* L.).

Antioksidan adalah zat yang membantu mencegah kerusakan sel dengan cara mengurangi reaksi oksidasi. Reaksi oksidasi adalah proses di mana radikal bebas, yaitu molekul dengan elektron yang tidak berpasangan, merusak sel tubuh. Beberapa contoh faktor atau sumber radikal bebas adalah proses metabolisme tubuh, asap rokok, polusi, serta radiasi dari perangkat elektronik seperti televisi, handphone, dan komputer (Kurniasih, 2019).

Aktivitas antioksidan dapat diketahui dengan nilai IC_{50} , semakin rendah nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Dalam mengukur aktivitas antioksidan, salah satu metode yang dapat digunakan adalah metode 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning, dengan nilai IC_{50} menunjukkan efisiensi antioksidan (Hidayah dkk., 2021).

2.7 Uji Aktivitas Antioksidan

2.7.1 Metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

Pengukuran antioksidan dilakukan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Metode DPPH ini merupakan cara yang sederhana, cepat, dan mudah untuk menguji aktivitas penangkapan radikal bebas. Metode ini sudah terbukti akurat dan praktis. Uji DPPH berfungsi sebagai radikal bebas yang mengandung senyawa nitrogen yang tidak stabil dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH akan tereduksi sehingga warnanya berubah menjadi kuning. Perubahan warna tersebut diukur menggunakan spektrofotometer. Penurunan intensitas warna terjadi karena hilangnya ikatan rangkap

terkondungsi pada DPPH. Hal ini terjadi bila ada penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, sehingga elektron tersebut tidak lagi bisa beresonansi (Masrifah dkk, 2017)

Interpretasi hasil uji antioksidan menggunakan metode DPPH dilakukan dengan mengukur dua variabel, yaitu kapasitas antioksidan dan persentase penghambatan. Kapasitas penghambatan dihitung berdasarkan nilai *Inhibitor Concentration* (IC_{50}), yang merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang mampu menghambat 50% aktivitas radikal bebas. Nilai IC_{50} memiliki hubungan terbalik dengan kapasitas antioksidan, artinya semakin kecil nilai IC_{50} , semakin tinggi kapasitas antioksidan dari sampel tersebut (Susanto, 2019).

2.7.2 Metode ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))

ABTS adalah cara yang digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dari suatu bahan. Cara ini menggunakan bahan kimia bernama 2,2'-azino-bis (3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) yang bekerja sebagai radikal bebas. Molekul ini berfungsi sebagai bahan makanan bagi enzim peroksidase, yang kemudian teroksidasi oleh peroksida (H_2O_2) dan menghasilkan ion radikal. Reaksi ABTS memiliki sifat kimia yang stabil dan mampu larut dalam lingkungan berair maupun berlemak. Prinsip utama dari metode ini adalah menilai kemampuan bahan antioksidan dalam menetralkan radikal bebas dengan memberikan proton kepada radikal bebas. Hal ini terlihat dari perubahan warna larutan yang awalnya biru kehijauan berubah menjadi tidak berwarna, disertai dengan penurunan jumlah kation radikal ABTS (Cano dan Arnao, 2018).

2.7.3 Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Metode FRAP mengukur kemampuan antioksidan untuk mengubah ion besi (Fe^{3+}) dalam kompleks feri-tripiridil-triazin (TPTZ) menjadi ion besi (Fe^{2+}), sehingga terjadi perubahan warna menjadi biru yang diukur pada panjang gelombang 593 nm.

Pereaksi FRAP terdiri dari campuran TPTZ dan besi (III) klorida heksahidrat yang dibutuhkan untuk membentuk kompleks Fe^{3+} . Selain itu, buffer asetat ditambahkan karena reaksi berlangsung pada kondisi pH asam sekitar 3,6. Dalam metode ini, bahan kimia antioksidan berfungsi sebagai reduktor dalam reaksi oksidasi-reduksi. Teknik FRAP bekerja dengan cara menetralkan radikal bebas melalui proses transfer elektron. (Benzie dan Devaki, 2017). Keuntungan dari metode FRAP ini adalah murah, mudah untuk membuat reagen, sangat cepat dan sederhana.

2.7.4 Metode CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*)

Metode Cuprac (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*) adalah salah satu metode yang digunakan untuk menentukan adanya aktivitas dan mengukur kapasitas antioksidan dari daun yodium terhadap radikal bebas yang absorbansinya diukur pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 450 nm.

Metode CUPRAC memiliki keuntungan dibandingkan metode pengukuran antioksidan lainnya karena reagen CUPRAC cepat dalam mengoksidasi tiap jenis antioksidan. Selain itu, pereaksi CUPRAC bersifat selektif karena memiliki potensi redoks yang lebih rendah (Maryam, dkk., 2015).

2.7.5 Metode ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) adalah metode yang digunakan untuk mengukur kemampuan antioksidan dalam memisahkan reaksi berantai radikal. Metode ini bekerja dengan memantau seberapa efektif antioksidan menghambat proses oksidasi radikal peroksil. Reaksi antara antioksidan dan radikal peroksil diinduksi oleh senyawa AAPH (*2,2'-azobis-2-amidino-propane*), sehingga terjadinya hilangnya fluoresensi pada fluorescein yang diukur menggunakan alat fluorimeter. ORAC menggunakan teknik area di bawah kurva (AUC) dengan membandingkan hasil ketika ada dan ketika tidak ada antioksidan. Sebagai referensi standar, biasanya digunakan antioksidan Trolox, sehingga nilai ORAC dari antioksidan yang diuji dihitung sebagai ekuivalen Trolox (Silvestrini, dkk., 2023).

2.8 IC₅₀ (*Inhibitory Concentration 50%*)

IC₅₀ adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas suatu radikal sebesar 50% (Purwanto, dkk., 2017). Keberadaan senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning, dengan nilai IC₅₀ menunjukkan efisiensi antioksidan (Maryam, dkk., 2023).

Tabel 2. 1 . Kadar Antioksida

No	IC ₅₀ (µg/ml)	Kategori
1	< 50	Sangat Kuat
2	50-100	Kuat
3	100-150	Sedang
4	150-200	Lemah
5	>200	Sangat Lemah