

## **OPTIMASI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK BUNGA ROSELLA, JERUK NIPIS, DAN KAYU MANIS DENGAN MIXTURE DESIGN MENGGUNAKAN METODE DPPH**

**Siti Julianti Khairani<sup>1</sup>, Rahma Safira<sup>2</sup>, Chelsy Budiartika<sup>3</sup>, Cindy Fatika Sari Gulo<sup>4</sup>,  
Nayla Gina Calesta<sup>5</sup>, Caca Pratiwi<sup>6</sup>**

[sitikhairani485@gmail.com](mailto:sitikhairani485@gmail.com)<sup>1</sup>, [raahmasafira@gmail.com](mailto:raahmasafira@gmail.com)<sup>2</sup>, [chelsybudiartika07@gmail.com](mailto:chelsybudiartika07@gmail.com)<sup>3</sup>,  
[cindyfatika675@gmail.com](mailto:cindyfatika675@gmail.com)<sup>4</sup>, [naylagina254@gmail.com](mailto:naylagina254@gmail.com)<sup>5</sup>, [cacapratwi@unimed.ac.id](mailto:cacapratwi@unimed.ac.id)<sup>6</sup>

**Universitas Negeri Medan**

### **ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak bunga rosella, jeruk nipis, dan kayu manis kering menggunakan metode DPPH serta menentukan komposisi campuran optimum melalui pendekatan mixture design. Sampel ketiga bahan dikeringkan, diekstraksi menggunakan air seduhan aquades mendidih, dan dianalisis kemampuan penangkapan radikal bebas DPPH pada panjang gelombang 517 nm. Mixture design menghasilkan 10 formulasi dengan proporsi berbeda untuk mengevaluasi pengaruh komposisi terhadap persen inhibisi. Hasil analisis menunjukkan bahwa perubahan proporsi ketiga komponen memberikan pengaruh signifikan terhadap aktivitas antioksidan ( $p < 0,05$ ). Kayu manis dan jeruk nipis menunjukkan aktivitas antioksidan individual yang lebih tinggi dibandingkan rosella, sedangkan interaksi tiga komponen secara simultan menghasilkan efek sinergis dengan kontribusi signifikan terhadap peningkatan persen inhibisi. Optimasi menggunakan Response Optimization menghasilkan komposisi optimum rosella 0,121226; jeruk nipis 0,545441; dan kayu manis 0,833333, dengan nilai inhibisi prediksi sebesar 95,86% dan desirability 1,00. Hasil ini menunjukkan bahwa kombinasi ketiga bahan, terutama pada proporsi kayu manis dan jeruk nipis yang lebih tinggi, mampu menghasilkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Penelitian ini menegaskan pentingnya pendekatan desain campuran dalam pengembangan formulasi pangan fungsional berbasis bahan alami.

**Kata Kunci:** Bunga Rosella, Jeruk Nipis, Kayu Manis, Aktivitas Antioksidan, DPPH, Desain Campuran.

### **ABSTRACT**

*This study aims to compare the antioxidant activity of rosella flower, lime, and dried cinnamon extracts using the DPPH method and to determine the optimum mixture composition through a mixture design approach. Samples of the three ingredients were dried, extracted using boiling distilled water, and analyzed for their DPPH free radical scavenging ability at a wavelength of 517 nm. Mixture design produced 10 formulations with different proportions to evaluate the effect of composition on the percentage of inhibition. The results of the analysis showed that changes in the proportions of the three components had a significant effect on antioxidant activity ( $p < 0.05$ ). Cinnamon and lime showed higher individual antioxidant activity than rosella, while the simultaneous interaction of the three components produced a synergistic effect with a significant contribution to the increase in the percentage of inhibition. Optimization using Response Optimization produced an optimal composition of rosella 0.121226; lime 0.545441; and cinnamon 0.833333, with a predicted inhibition value of 95.86% and desirability of 1.00. These results indicate that the combination of the three ingredients, especially at higher proportions of cinnamon and lime, can produce very strong antioxidant activity. This study emphasizes the importance of a mixture design approach in the development of functional food formulations based on natural ingredients.*

**Keywords:** Rosella flower, Lime, Cinnamon, Antioxidant Activity, DPPH, Mixture Design..

## PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul reaktif yang memiliki elektron tidak berpasangan sehingga dapat memicu kerusakan oksidatif pada sel dan jaringan. Ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem pertahanan antioksidan tubuh menyebabkan stres oksidatif yang berperan dalam perkembangan berbagai penyakit degeneratif, seperti penyakit kardiovaskular, kanker, diabetes, hingga penuaan dini. Untuk menekan dampak tersebut, tubuh membutuhkan senyawa antioksidan yang mampu menetralkan radikal bebas dengan cara mendonorkan elektron atau atom hidrogen sehingga reaktivitas radikal dapat dikurangi (Rodiatullah et al., 2023)

Salah satu sumber antioksidan yang penting adalah pangan fungsional, yaitu bahan pangan yang tidak hanya menyediakan zat gizi dasar, tetapi juga mengandung komponen bioaktif yang memberikan efek fisiologis bermanfaat (Liu, 2004; Scalbert et al., 2005). Senyawa bioaktif tersebut dapat berupa polifenol seperti flavonoid, antosianin, dan asam fenolat, serta vitamin antioksidan seperti vitamin C dan E, karotenoid, kurkuminoid, dan metabolit sekunder lainnya. Senyawa-senyawa ini bekerja melalui beberapa mekanisme, antara lain menetralisir radikal bebas, mengelat ion logam pemicu oksidasi berantai, memadamkan oksigen singlet, serta memodulasi aktivitas enzim antioksidan tubuh (Prior et al., 2005; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Efektivitas aktivitas antioksidan ini dipengaruhi oleh varietas tanaman, tingkat kematangan, proses pengolahan, ukuran partikel, metode ekstraksi, dan ketersediaan hayati setelah pencernaan (Scalbert et al., 2005).

Dalam analisis aktivitas antioksidan, metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) merupakan salah satu uji in-vitro yang paling banyak digunakan karena sederhana, cepat, dan sensitif. DPPH adalah radikal stabil berwarna ungu dengan puncak serapan sekitar 517 nm. Ketika bereaksi dengan senyawa antioksidan, warnanya memudar sehingga nilai absorbansi menurun. Penurunan absorbansi tersebut digunakan untuk menghitung persen inhibisi dan nilai  $IC_{50}$ , yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menurunkan 50% aktivitas radikal DPPH. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$ , semakin kuat aktivitas antioksidan suatu sampel (Rodiatullah et al., 2023). Namun, hasil pengujian dapat dipengaruhi oleh stabilitas larutan DPPH, jenis pelarut, suhu dan waktu inkubasi, paparan cahaya, serta komponen matriks seperti gula, serat, dan protein.

Beberapa bahan alam diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, di antaranya rosella (*Hibiscus sabdariffa*), jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), dan kayu manis (*Cinnamomum burmannii*). Rosella mengandung antosianin dan flavonoid yang berperan penting dalam aktivitas antioksidannya. Penelitian menunjukkan bahwa ekstrak rosella memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,01  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan vitamin C sebagai pembanding memiliki  $IC_{50}$  43,29  $\mu\text{g/mL}$  (Rodiatullah et al., 2023). Penelitian (Syahara et al., 2023) juga menunjukkan bahwa biji rosella mengandung fenolik dan asam lemak tidak jenuh yang mendukung aktivitas antioksidan tinggi dengan  $IC_{50}$  30,158  $\mu\text{g/mL}$ .

Jeruk nipis juga merupakan sumber antioksidan yang baik karena kandungan vitamin C dan flavonoidnya. Ekstrak etanol kulit jeruk nipis dilaporkan memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar 110,52 ppm, yang menunjukkan aktivitas antioksidan sedang hingga kuat tergantung fraksi pelarut yang digunakan (Sari et al., 2021). Kayu manis mengandung

cinnamaldehyde, eugenol, dan senyawa fenolik lainnya. Penelitian menunjukkan bahwa fraksi hidrofil kayu manis memiliki aktivitas antioksidan yang cukup kuat dengan nilai  $IC_{50}$  44,87  $\mu\text{g/mL}$ , sedangkan ekstrak etanolnya memiliki  $IC_{50}$  74,18  $\mu\text{g/mL}$ . Aktivitas paling rendah terdapat pada fraksi lipofil dengan  $IC_{50}$  643,62  $\mu\text{g/mL}$  (Rosa et al., 2023).

Ketiga tanaman tersebut memiliki potensi antioksidan yang berbeda-beda, namun penelitian yang secara langsung membandingkan aktivitas antioksidan rosella, jeruk nipis, dan kayu manis dalam bentuk kering dan diuji dengan metode yang sama masih terbatas. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menentukan dan membandingkan aktivitas antioksidan ketiga bahan tersebut menggunakan metode DPPH, sehingga diperoleh gambaran bahan mana yang memiliki potensi antioksidan terbaik.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 13 November 2025 di Laboratorium Analisis Zat Gizi, Program Studi Gizi, Universitas Negeri Medan. Penelitian menggunakan metode eksperimen dengan mixture design untuk mengetahui pengaruh komposisi campuran bunga rosella, jeruk nipis, dan kayu manis terhadap aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

### Alat dan Bahan

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung reaksi 5 buah, rak tabung, alumunium foil, mikropipet, yellow tip, blue tip, rak tabung reaksi, fortex, timbangan analitik, dan spektrofotometer. Kemudian bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bunga rosella, jeruk nipis, kayu manis, water one atau akuades panas untuk ekstraksi air, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), kontrol positif yaitu asam askorbat atau trolox, dan pelarut yaitu metanol absolut atau metanol 96% (konsisten dengan pelarut DPPH)

### Prosedur Penelitian

#### 1. Persiapan sampel

Bahan rosella, jeruk nipis, dan kayu manis masing-masing dicuci dan dikeringkan menggunakan dehydrator pada suhu 55°C selama 6 jam. Setelah kering, bahan disimpan dalam wadah tertutup.

#### 2. Pembuatan formula

Penelitian ini menggunakan mixture design dengan tiga komponen utama, yaitu bunga rosella, jeruk nipis, dan kayu manis. disusun menggunakan software Minitab melalui Mixture Design, sehingga menghasilkan kombinasi proporsi komponen yang telah dioptimasi secara statistik. Total campuran untuk setiap formulasi ditetapkan sebanyak 1,5 gram, sedangkan proporsi masing-masing bahan ditentukan oleh Minitab yang menghasilkan 10 perlakuan sebagai berikut:

| Formulasi Sampel | Bunga Rosella | Jeruk Nipis | Kayu Manis |
|------------------|---------------|-------------|------------|
| 1                | 1,50          | 0,00        | 0,00       |
| 2                | 0,00          | 1,50        | 0,00       |
| 3                | 0,00          | 0,00        | 1,50       |
| 4                | 0,75          | 0,75        | 0,00       |
| 5                | 0,75          | 0,00        | 0,75       |
| 6                | 0,00          | 0,75        | 0,75       |

|    |      |      |      |
|----|------|------|------|
| 7  | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| 8  | 1,00 | 0,25 | 0,25 |
| 9  | 0,25 | 1,00 | 0,25 |
| 10 | 0,25 | 0,25 | 1,00 |

### 3. Persiapan larutan

#### Ekstrak teh

- Timbang 1,5 g sampel sesuai dengan formulasi. Seduh sampel dengan 75 mL air aquedes mendidih (100°C)
- Aduk/swirl terus menerus 3-5 menit sampai ekstraksi sempurna, saring (Whatman No.1)/saringan, simpan 4 °C sebelum analisi lebih lanjut.
- Setelah proses ekstraksi, filtrat dipipet sebanyak 1 mL kemudian dibagi ke dalam dua gelas tabung reaksi sebagai ulangan duplo untuk analisis DPPH.

#### Larutan DPPH

- Siapkan DPPH 5,9 mg dalam 100 ml metanol. Simpan gelap (bungkus foil).

#### Prosedur uji DPPH

- Label tabung untuk tiap konsentrasi, kontrol, dan blanko.
- Campurkan 1 mL ekstrak sampel + 2 mL DPPH. Vortex singkat sampai tercampur merata.
- Kontrol DPPH (A\_control): 1 mL pelarut + 2 mL DPPH.
- Blanko sampel (A\_sample,blank): 1 mL sampel + 2 mL pelarut (tanpa DPPH) untuk mengoreksi warna teh.
- Inkubasi 30 menit pada suhu ruang dalam gelap.
- Baca absorbansi pada 517 nm terhadap pelarut sebagai referensi.
- Lakukan triplo untuk setiap titik.

#### Perhitungan

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A_{kontrol} - A_{sample}}{A_{kontrol}} \times 100$$

## HASIL DAN PEMBAHSAN

### Data Hasil Penelitian

| Formulasi Sampel | Bunga Rosella | Jeruk Nipis | Kayu Manis | Pengulangan | %inhibisi | Rata-rata |
|------------------|---------------|-------------|------------|-------------|-----------|-----------|
| 1                | 1,5044        | 0,00        | 0,00       | 1           | 80,27%    | 78,725%   |
|                  |               |             |            | 2           | 77,18%    |           |
| 2                | 0,00          | 1,5049      | 0,00       | 1           | 94,02%    | 94,13%    |
|                  |               |             |            | 2           | 94,24%    |           |
| 3                | 0,00          | 0,00        | 1,5035     | 1           | 94,45%    | 94,61%    |
|                  |               |             |            | 2           | 94,77%    |           |
| 4                | 0,7522        | 0,7522      | 0,00       | 1           | 72,38%    | 79,60%    |
|                  |               |             |            | 2           | 74,94%    |           |
| 5                | 0,7539        | 0,00        | 0,7514     | 1           | 86,46%    | 86,36%    |
|                  |               |             |            | 2           | 86,24%    |           |
| 6                | 0,00          | 0,7528      | 0,7548     | 1           | 95,52%    | 95,305%   |
|                  |               |             |            | 2           | 95,09%    |           |
| 7                | 0,5013        | 0,5014      | 0,5015     | 1           | 91,79%    | 91,415%   |
|                  |               |             |            | 2           | 91,04%    |           |

|    |        |        |        |   |        |         |
|----|--------|--------|--------|---|--------|---------|
| 8  | 1,0011 | 0,2544 | 0,2538 | 1 | 81,76% | 82,24%  |
|    |        |        |        | 2 | 82,72% |         |
| 9  | 0,2523 | 1,0016 | 0,2544 | 1 | 91,47% | 91,2%   |
|    |        |        |        | 2 | 90,93% |         |
| 10 | 0,2555 | 0,2550 | 1,0012 | 1 | 94,45% | 94,345% |
|    |        |        |        | 2 | 94,24% |         |

### Pembahasan

| Source                                     | DF | Seq SS  | Adj SS  | Adj MS  | F-Value | P-Value |
|--|----|---------|---------|---------|---------|---------|
| Regression                                 | 6  | 1046,51 | 1046,51 | 174,418 | 210,25  | 0,000   |
| Linear                                     | 2  | 772,33  | 361,68  | 180,839 | 217,99  | 0,000   |
| Quadratic                                  | 3  | 186,49  | 232,87  | 77,624  | 93,57   | 0,000   |
| Bunga<br>Rosella*Jeruk Nipis               | 1  | 144,01  | 216,73  | 216,728 | 261,25  | 0,000   |
| Bunga<br>Rosella*Kayu<br>Manis             | 1  | 13,06   | 0,23    | 0,230   | 0,28    | 0,608   |
| Jeruk Nipis*Kayu<br>Manis                  | 1  | 29,41   | 1,31    | 1,307   | 1,58    | 0,232   |
| Special Cubic                              | 1  | 87,69   | 87,69   | 87,687  | 105,70  | 0,000   |
| Bunga<br>Rosella*Jeruk<br>Nipis*Kayu Manis | 1  | 87,69   | 87,69   | 87,687  | 105,70  | 0,000   |
| Residual Error                             | 13 | 10,78   | 10,78   | 0,830   |         |         |
| Lack-of-Fit                                | 3  | 1,64    | 1,64    | 0,548   | 0,60    | 0,630   |
| Pure Error                                 | 10 | 9,14    | 9,14    | 0,914   |         |         |
| Total                                      | 19 | 1057,29 |         |         |         |         |

Hasil analisis ANOVA menunjukkan bahwa model campuran yang digunakan signifikan terhadap nilai % inhibisi, ditunjukkan oleh nilai p yang sangat kecil ( $p < 0,05$ ). Artinya, perubahan komposisi tiga bahan dari rosella, jeruk nipis, dan kayu manis, memberikan pengaruh nyata terhadap aktivitas antioksidan. Selain itu, beberapa komponen model, seperti efek linear, kuadratik, maupun interaksi antarkomponen, juga signifikan. Hal ini menandakan bahwa respons antioksidan tidak hanya ditentukan oleh satu bahan secara tunggal, tetapi juga oleh bagaimana ketiga bahan tersebut berinteraksi satu sama lain dalam campuran.

Selanjutnya, nilai lack-of-fit yang tidak signifikan menunjukkan bahwa model regresi yang digunakan cocok dengan data percobaan. Dengan kata lain, variasi residual tidak berasal dari kesalahan model, sehingga model dapat digunakan untuk memprediksi aktivitas antioksidan dengan baik. Ketepatan model ini sangat penting dalam penelitian berbasis campuran, karena hasil optimasi dan contour plot hanya valid jika modelnya memang sesuai dengan data sebenarnya. Selain itu, signifikansi interaksi antar bahan dalam model menunjukkan bahwa peningkatan atau penurunan satu komponen dapat memengaruhi efek komponen lainnya. Misalnya, jeruk nipis mungkin meningkatkan efek kayu manis ketika berada pada proporsi tertentu, tetapi efek tersebut dapat berubah jika rosella ditambahkan dalam jumlah lebih besar. Pola interaksi seperti ini sering terjadi pada sistem yang mengandung senyawa bioaktif karena adanya fenomena sinergi atau antagonisme. Hal ini sesuai dengan penelitian yang melaporkan bahwa kombinasi fenolik

atau ekstrak tumbuhan dapat menunjukkan interaksi yang kompleks, sehingga efek campuran tidak selalu sama dengan penjumlahan aktivitas bahan tunggalnya (Sarastri et al., 2023).

## **Respon Optimization**

### **Parameters**

|                           | <b>Goal</b> | <b>Lower</b> | <b>Target</b> | <b>Upper</b> | <b>Weight</b> | <b>Import</b> |
|---------------------------|-------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|
| % inhibisi                | maximum     | 72,38        | 95,52         | 95,52        | 1             | 1             |
| <b>Respon Optimasi</b>    |             |              |               |              |               |               |
| <b>Komponen</b>           |             |              |               |              |               |               |
| Bunga Rosella             | Jeruk Nipis | Kayu Manis   |               |              |               |               |
| 0,121226                  | 0,545441    | 0,833333     |               |              |               |               |
| <b>Predicted Response</b> |             |              |               |              |               |               |
| % Inhibisi                |             | 95,8632      |               |              |               |               |
| Desirability              |             | 1,000000     |               |              |               |               |

Hasil uji DPPH yang dianalisis menggunakan Response Optimization pada Minitab menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak rosella, jeruk nipis, dan kayu manis memiliki potensi antioksidan yang sangat tinggi dengan nilai inhibisi mencapai 95,8632%, dan nilai composite desirability sebesar 1,000, yang menandakan bahwa model ini memberikan kondisi optimum sesuai target maksimal aktivitas antioksidan. Komposisi optimum yang diperoleh terdiri atas rosella 0,121226, jeruk nipis 0,545441, dan kayu manis 0,833333, yang memberikan aktivitas antioksidan tertinggi dibandingkan proporsi lain.

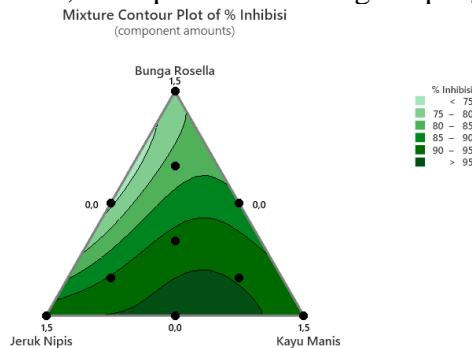
Secara ilmiah, tingginya aktivitas antioksidan pada formula campuran sejalan dengan bukti bahwa ekstrak rosella kaya akan antosianin dan senyawa fenolik yang berperan sebagai donor elektron untuk menetralkan radikal bebas. Sebagai contoh, studi “Anthocyanin isolation from Hibiscus sabdariffa L. flowers by extraction, macroporous D101 resin purification, and biological evaluation” menunjukkan bahwa fraksi antosianin dari bunga rosella dengan komponen utama Cyanidin-3-O-sambubioside memiliki aktivitas antioksidan tinggi berdasarkan uji DPPH, ABTS, dan FRAP. Hasil ini mendukung asumsi bahwa antosianin merupakan kontributor utama terhadap kapasitas scavenging radikal bebas ekstrak rosella (Ngoc et al., 2023).

Selain itu, komponen dari kulit kayu manis juga dapat mendukung aktivitas antioksidan dalam campuran. Misalnya, penelitian yang menggunakan teknik GC-MS mengidentifikasi bahwa minyak kulit kayu manis (*C. cassia*) mengandung senyawa seperti Cinnamaldehyde dan Eugenol senyawa fenolik yang secara luas diakui memiliki potensi antioksidan dan aktivitas bioaktif lainnya. Kombinasi antara antosianin/phenolik dari rosella dan fenolik dari kayu manis dapat menghasilkan efek sinergis, yang memperkuat kemampuan penangkapan radikal bebas konsisten dengan hasil optimasi Anda yang menunjukkan 95,86% inhibisi (Basid & Prasetya, n.d.).

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) telah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan berdasarkan uji DPPH dan kandungan fitokimia seperti flavonoid dan total fenol. Sebagai contoh, dalam penelitian “Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanolik serta Krim Kulit Jeruk Nipis dengan Metode DPPH” dilaporkan bahwa ekstrak etanolik kulit jeruk nipis menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> yang menunjukkan potensi moderatkuat (Sari et al., 2021b). Selain itu, studi “Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) secara Spektrofotometri UV-Vis” juga

mencatat bahwa ekstrak etanol daun jeruk nipis mampu melakukan peredaman radikal bebas, mengindikasikan bahwa bagian tanaman ini baik kulit maupun daun mengandung senyawa aktif yang mampu mendonorkan elektron untuk menetralkan radikal DPPH (Yanuarty, 2021).

Dengan demikian, hasil Minitab yang menunjukkan aktivitas inhibisi maksimum 95,86% dapat dijelaskan oleh kekayaan fitokimia masing-masing ekstrak yang saling mendukung. Kombinasi rosella, jeruk nipis, dan kayu manis memberikan aktivitas antioksidan yang lebih kuat, stabil, dan optimal dibandingkan penggunaan ekstrak tunggal.



Mixture contour plot menunjukkan bagaimana persentase inhibisi berubah sesuai kombinasi tiga bahan, yaitu rosella, jeruk nipis, dan kayu manis. Pada plot, area warna gelap menunjukkan nilai inhibisi yang lebih tinggi, sedangkan warna lebih terang menunjukkan nilai lebih rendah. Dari pola yang terlihat, campuran yang mengandung proporsi kayu manis dan jeruk nipis lebih besar cenderung berada pada zona warna hijau gelap. Artinya, kedua bahan tersebut memberikan kontribusi lebih kuat terhadap peningkatan aktivitas antioksidan dibandingkan rosella. Hasil ini sesuai dengan konsep bahwa setiap komponen dalam campuran dapat saling memperkuat atau melemahkan (synergy/antagonism) tergantung komposisinya (Skroza et al., 2022).

Dominasi warna gelap pada area dengan proporsi kayu manis menunjukkan bahwa bahan ini memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Kayu manis kaya akan senyawa fenolik seperti cinnamaldehyde dan eugenol yang bekerja efektif sebagai donor proton dalam reaksi DPPH (Lomer, 2025). Jeruk nipis juga memberikan kontribusi cukup besar karena mengandung vitamin C dan flavonoid yang mampu mereduksi radikal bebas secara cepat (Khasanah & Ulfah, 2014). Ketika kedua bahan ini dikombinasikan, aktivitas inhibisinya terlihat meningkat yang ditunjukkan oleh gradasi warna yang semakin pekat, sehingga mengindikasikan adanya efek sinergis antar senyawa antioksidan pada konsentrasi tertentu.

Di sisi lain, area yang didominasi rosella terlihat menghasilkan warna lebih terang, artinya aktivitas inhibisinya lebih rendah dibanding dua komponen lain. Meskipun rosella mengandung antosianin yang bersifat antioksidan, pengaruhnya dalam campuran ini tidak sekuat kayu manis atau jeruk nipis pada konsentrasi yang diuji. Hal ini mungkin disebabkan perbedaan kelarutan, kestabilan senyawa, atau interaksi antar komponen dalam campuran (Wu et al., 2018). Sehingga, pola pada mixture contour plot mendukung hasil optimasi, yaitu bahwa kombinasi terbaik untuk mencapai aktivitas antioksidan tertinggi adalah campuran dengan proporsi kayu manis paling besar, diikuti jeruk nipis, dan hanya sedikit rosella.

### Regression for Mixture: % Inhibisi versus Bunga Rosella; Jeruk Nipis; Kayu Manis

| Term                                 | Coef   | SE Coef | T-Value | P-Value | VIF  |
|--------------------------------------|--------|---------|---------|---------|------|
| Bunga Rosella                        | 78,715 | 0,623   | *       | *       | 1,97 |
| Jeruk Nipis                          | 94,347 | 0,623   | *       | *       | 1,97 |
| Kayu Manis                           | 94,490 | 0,623   | *       | *       | 1,97 |
| Bunga Rosella*Jeruk Nipis            | -50,66 | 3,13    | -16,16  | 0,000   | 2,38 |
| Bunga Rosella*Kayu Manis             | -1,65  | 3,13    | -0,53   | 0,608   | 2,38 |
| Jeruk Nipis*Kayu Manis               | 3,93   | 3,13    | 1,26    | 0,232   | 2,38 |
| Bunga Rosella*Jeruk Nipis*Kayu Manis | 212,4  | 20,7    | 10,28   | 0,000   | 2,47 |

Hasil analisis regresi campuran menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak rosella, jeruk nipis, dan kayu manis kering memberikan pengaruh yang sangat signifikan terhadap persentase inhibisi radikal bebas DPPH. Hasil estimasi koefisien regresi menunjukkan bahwa secara individu ketiga bahan memiliki kontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Ekstrak jeruk nipis (94,35) dan kayu manis (94,49) memiliki koefisien yang lebih tinggi dibandingkan rosella (78,72), yang menunjukkan bahwa jeruk nipis dan kayu manis secara mandiri memberikan kemampuan penangkapan radikal bebas yang lebih besar. Tingginya aktivitas antioksidan jeruk nipis berkaitan erat dengan kandungan vitamin C dan flavonoid yang berperan sebagai donor elektron dalam menetralsir radikal bebas (Rahmiati et al., 2024). Sementara itu, kayu manis diketahui kaya akan senyawa fenolik dan sinamaldehid yang memiliki aktivitas antioksidan kuat melalui mekanisme pemutusan rantai reaksi oksidasi (Pagliari et al., 2023).

Namun, hasil analisis juga menunjukkan bahwa tidak semua kombinasi dua bahan memberikan efek yang saling menguatkan. Interaksi antara rosella dan jeruk nipis menunjukkan koefisien negatif yang signifikan (-50,66;  $p = 0,000$ ), yang menandakan adanya efek antagonis pada kombinasi tertentu. Fenomena ini diduga terjadi akibat perbedaan stabilitas senyawa aktif antar ekstrak, di mana vitamin C yang bersifat sangat reaktif dapat mengalami degradasi atau berkompetisi dengan senyawa fenolik rosella dalam sistem reaksi DPPH. Menurut Gulcin & Alwasel (2023), interaksi antar senyawa antioksidan salah satu komponen akibat kompetisi mekanisme reaksi.

Sebaliknya, interaksi tiga komponen secara simultan ( $\text{rosella} \times \text{jeruk nipis} \times \text{kayu manis}$ ) menunjukkan koefisien yang sangat besar dan signifikan (212,4;  $p = 0,000$ ), yang mengindikasikan adanya efek sinergis yang kuat. Efek ini menunjukkan bahwa ketika ketiga ekstrak dikombinasikan pada proporsi tertentu, kemampuan antioksidan yang dihasilkan jauh lebih tinggi dibandingkan penggunaan satu atau dua ekstrak saja. Sinergi ini diduga terjadi karena adanya mekanisme saling melengkapi antara antosianin rosella, vitamin C dari jeruk nipis, dan senyawa fenolik kayu manis dalam menangkap berbagai jenis radikal bebas. Temuan ini sejalan dengan penelitian Pagliari et al. (2023) yang menyatakan bahwa kombinasi senyawa fenolik dan flavonoid dari sumber yang berbeda mampu meningkatkan stabilitas dan efektivitas antioksidan secara signifikan.

Hasil ini menegaskan bahwa aktivitas antioksidan tidak hanya ditentukan oleh kekuatan masing-masing ekstrak secara tunggal, tetapi sangat dipengaruhi oleh interaksi antar komponen dalam campuran. Oleh karena itu, penggunaan pendekatan desain campuran menjadi sangat penting dalam pengembangan produk berbasis bahan alam, khususnya untuk menghasilkan formulasi dengan aktivitas antioksidan yang optimal.

Metode DPPH sendiri merupakan metode yang sensitif dan banyak digunakan untuk mengevaluasi kemampuan senyawa dalam mendonorkan atom hidrogen atau elektron terhadap radikal bebas, sehingga sangat relevan digunakan dalam penelitian ini (Munteanu & Apetrei, 2021).

| S        | R-sq   | R-sq(adj) | PRESS   | R-sq(pred) |
|----------|--------|-----------|---------|------------|
| 0,910811 | 98,98% | 98,51%    | 32,9718 | 96,88%     |

Berdasarkan Model Summary, diperoleh nilai  $R^2$  sebesar 98,98% dan  $R^2$  prediksi sebesar 96,88%, yang menandakan bahwa hampir seluruh variasi respon aktivitas antioksidan dapat dijelaskan oleh komposisi campuran ketiga ekstrak tersebut. Nilai ini menunjukkan bahwa model yang dibangun memiliki ketepatan yang sangat tinggi serta layak digunakan sebagai dasar prediksi dan optimasi formulasi. Hal ini sejalan dengan penelitian Munteanu & Apetrei (2021) yang menyatakan bahwa desain campuran sangat efektif digunakan untuk mengevaluasi sinergi senyawa antioksidan dalam sistem multikomponen.

## KESIMPULAN

Penelitian menunjukkan bahwa ketiga ekstrak rosella, jeruk nipis, dan kayu manis memiliki aktivitas antioksidan, namun tingkatnya berbeda. Kayu manis dan jeruk nipis memberikan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibandingkan rosella. Kombinasi ketiganya menghasilkan efek sinergis yang meningkatkan persen inhibisi radikal bebas DPPH. Hasil optimasi menunjukkan komposisi terbaik yaitu rosella 0,12, jeruk nipis 0,55, dan kayu manis 0,83, dengan aktivitas antioksidan prediksi sebesar 95,86% dan desirability 1,00. Ini menandakan bahwa formula campuran dapat memberikan aktivitas antioksidan yang sangat kuat, dan model mixture design yang digunakan sudah valid serta akurat dalam memprediksi respon.

## DAFTAR PUSTAKA

- Basid, N., & Prasetya, A. (N.D.). Identifikasi Senyawa Penyusun Minyak Kulit Batang Kayu Manis ( *Cinnamomum Cassia* ) Menggunakan Gc-Ms. 81–83.
- Gulcin, İ., & Alwasel, S. H. (2023). Dpph Radical Scavenging Assay. Processes, 11(8), 1–20. <Https://Doi.Org/10.3390/Pr11082248>
- Khasanah, I., & Ulfah, M. (N.D.). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanolik Kulit Buah Jeruk Nipis ( *Citrus Aurantifolia* ) Dengan Metode Dpph ( 1 , 1-Difenil-2- Pikrilhidrazil ). 9–17.
- Liu, R. H. (2004). Nutrition , And Cancer Potential Synergy Of Phytochemicals In Cancer Prevention : Mechanism Of Action. The Journal Of Nutrition, 134(12), 3479s-3485s. <Https://Doi.Org/10.1093/Jn/134.12.3479s>
- Lomer, B. B. (2025). Enrichment Of Oil Cake With Cinnamon Extract Positively Effects Antioxidant Activity And Textural Profile. 1–15. <Https://Doi.Org/10.1002/Fsn3.4714>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used In Determining Antioxidant Activity: A Review. International Journal Of Molecular Sciences, 22(7), 1–30. <Https://Doi.Org/10.3390/Ijms22073380>
- Ngoc, T., Hoang, N., Phuong, N., Nguyen, M., Anh, T., Dong, D., Hong, T., & Le, A. (2023). Anthocyanin Isolation From Hibiscus Sabdariffa L . Flowers By Extraction , Macroporous D101 Resin Purification , And Biological Evaluation. Journal Of Agriculture And Food Research, 14(November), 100848. <Https://Doi.Org/10.1016/J.Jafr.2023.100848>
- Pagliari, S., Forcella, M., Lonati, E., Sacco, G., Romaniello, F., Rovellini, P., Fusi, P., Palestini, P.,

- Campone, L., Labra, M., Bulbarelli, A., & Bruni, I. (2023). Antioxidant And Anti-Inflammatory Effect Of Cinnamon. *Foods*, 12(3), 1–18.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods For The Determination Of Antioxidant Capacity And Phenolics In Foods And Dietary Supplements. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. [Https://Doi.Org/10.1021/Jf0502698](https://doi.org/10.1021/jf0502698)
- Rahmiati, N., Sari, R., Wahyuni, T. S., & Lestari, M. L. A. D. (2024). Enhancing Antioxidant Properties Of Lime Juice Powder Through Polyelectrolyte Microparticles Of Chitosan-Alginate: Formulation, Characterization And Stability Study Nur. *Journal Of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 15(1), 231–236. [Https://Doi.Org/10.4103/Japtr.Japtr](https://doi.org/10.4103/Japtr.Japtr)
- Rodiatullah, Fardani, R. A., Halid, I., & Atfal, B. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Rosella ( Hibiscus Pirkilhidrazyl ( Dpph ). *Jsn : Jurnal Sains Natural*, 1(4), 97–199.
- Rosa, R., Usman, H., & Desra, A. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kayu Manis ( Cinnamomum Burmanii ). *Sitawa : Jurnal Farmasi Sains Dan Obat Tradisional*, 2(1), 151–158.
- Sarastri, D., Rohana, E., Saraswati, I., Farmasi, P. S., Kedokteran, F., & Diponegoro, U. (2023). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Jahe ( Zingiber Officinale Roscoe .) Dan Daun Jeruk Purut ( Citrus Hystric Dc .). 45–54.
- Sari, W. Y., Yuliastuti, D., & Hidayati, I. G. (2021a). Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanolik Serta Krim Kulit Jeruk Nipis ( Citrus Aurantiifolia ( Christm .) Swingle ) Dengan Metode Dpph. *Pharmacy: Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(2), 351–360.
- Sari, W. Y., Yuliastuti, D., & Hidayati, I. G. (2021b). Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanolik Serta Krim Kulit Jeruk Nipis ( Citrus Aurantiifolia ( Christm .) Swingle ) Dengan Metode Dpph Phytochemical Screening And Antioxidant Activity Evaluation Of Cream Containing Ethanolic Fraction Of Lime ( Citrus Aurantiifolia ( Christm .) Swingle ) Peel By Dpph Method. 18(02), 351–360.
- Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: Antioxidants And Beyond 1–3. *The American Journal Of Clinical Nutrition*, 81(1), 215s-217s. [Https://Doi.Org/10.1093/Ajcn/81.1.215s](https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.215s)
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics And Polyphenolics In Foods , Beverages And Spices : Antioxidant Activity And Health Effects –A Review. *Journal Of Functional Foods*, 18, 820–897. [Https://Doi.Org/10.1016/J.Jff.2015.06.018](https://doi.org/10.1016/J.Jff.2015.06.018)
- Skroza, D., Šimat, V., Vrdoljak, L., Joli, N., Skelin, A., Cagalj, M., & Frleta, R. (2022). Investigation Of Antioxidant Synergisms And Antagonisms Among Phenolic Acids In The Model Matrices Using Frap And Orac Methods.
- Syahara, M. A., Helilusiatiningsih, N., & Irawati, T. (2023). Antioxidant Activity Assay Of Roselle ( Hibiscus Sabdariffa ) Seeds Ethanol Extract With Dpph Radical Scavenging Using Uv-Vis Spectrophotometer. *Journal Of Natural Sciences And Mathematics Research*, 10(1), 46–55.
- Wu, H., Yang, K., & Chiang, P. (2018). Roselle Anthocyanins : Antioxidant Properties And. [Https://Doi.Org/10.3390/Molecules23061357](https://doi.org/10.3390/Molecules23061357)
- Yanuary, R. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Daun Jeruk Nipis (Citrus Aurantifolia) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Farmasindo: Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat*, 5(1), 53–56.