

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Preparasi Sampel Buah Jeruk

Antioksidan merupakan zat yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi, yang mampu melindungi sel dari efek berbahaya radikal bebas oksigen reaktif jika berkaitan dengan penyakit. Radikal bebas ini dapat berasal dari metabolisme tubuh maupun faktor eksternal.¹ Antioksidan alami banyak ditemukan pada buah-buahan dan sayur-sayuran, salah satunya adalah buah jeruk. Buah jeruk mengandung beberapa komponen bioaktif seperti flavonoid, terpenoid, kumarin, limonoid, dan lain-lain.^{2,3}

Pada penelitian ini, dilakukan uji aktivitas antioksidan pada buah jeruk siam (*Citrus nobilis* LOUR var. *microcarpa* Hassk.). Jeruk siam berasal dari Siam (Muangthai). Orang Siam menyebut jeruk ini dengan sebutan *som kin wan*. Jenis jeruk ini mampu berbuah beberapa kali dalam setahun, karena setiap kali sesudah masa kering, tanaman akan membentuk cabang-cabang baru yang berbunga. Jeruk siam

¹ Wikipedia, "Antioksidan" dalam <http://id.wikipedia.org/wiki/antioksidan>, diakses pada tanggal 1 Oktober 2013.

² M. Fadlinizal Abd Ghafar, *et.al.*, "Flavoid, Hesperidin, Total Phenolic Content and Antioxidan Activities from Citrus Species" Full Length Research Paper, (vol. 9 (3), Januari 2010), hlm. 328

³ Anna R. Protegente, *et.al.*, "The Compotional Characterization and Antioxidant Activity of Fresh Juices from Sicilian Sweet Orange (*Citrus Sinensis* L. Osbeck)" Taylor & Francis Healthsciences, (vol. 37, November 2003), hlm. 681

merupakan jeruk lokal yang banyak diusahakan dan tersebar luas di Indonesia, harganya lebih ekonomis, tahan agak lama, mudah penyimpanannya, serta untuk meningkatkan taraf hidup para petani jeruk lokal.⁴ Pengujian ini bertujuan untuk menunjukkan bahwa dalam jeruk siam mengandung antioksidan dan metabolit sekunder diantaranya adalah flavonoid dan terpenoid. Metode yang digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan pada jeruk siam adalah metode DPPH, karena metode DPPH merupakan metode yang paling sederhana, mudah dan cepat dibandingkan dengan metode-metode yang lain.

Pengujian adanya aktivitas antioksidan pada jeruk siam diawali dengan preparasi sampel. Jeruk siam yang diuji aktivitas antioksidan ditunjukkan pada Gambar 4.1 dibawah ini.



Gambar 4.1 Sampel jeruk siam (*Citrus nobilis* LOUR var. *microcarpa* Hassk.)

⁴ AAK, *Budidaya Tanaman Jeruk*, (Yogyakarta: Kanisius, 1999), hlm. 13

Preparasi sampel pada buah jeruk siam dilakukan dengan cara mengupas kulit buah jeruk terlebih dahulu, kemudian diambil daging buah jeruk, lalu diperas buahnya hingga menjadi sari jeruk yang selanjutnya dilakukan proses filtrasi dengan menggunakan kertas saring. Filtrasi adalah proses pemisahan dari campuran heterogen yang mengandung cairan dan partikel-partikel padat dengan menggunakan media filter yang hanya meloloskan cairan dan menahan partikel-partikel padat.⁵

Proses filtrasi tersebut berlangsung sangat lama, karena sari jeruk yang diperoleh cukup kental sehingga perlu diaduk dengan irama yang pelan agar filtrat dari sari jeruk dapat tersaring. Pengadukan dengan tekanan dan irama yang cepat pada proses penyaringan akan menyebabkan kertas saring sobek sehingga proses penyaringan harus diulangi kembali, karena kemungkinan ada residu yang masuk kedalam filtrat yang telah dihasilkan sebelumnya.

Sari jeruk siam kemudian dimasukkan sedikit demi sedikit maksimal tiga seperempat dari corong kaca agar sampel tidak tumpah saat diaduk. Filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator*. Suhu penguapan yang digunakan 60°C, karena pada suhu tersebut kemungkinan adanya air yang terkandung dalam filtrat jeruk siam akan teruapkan.⁶ Proses

⁵ Zulfikar, “Filtrasi”, dalam http://www.chemistry.org/materi_kimia/kimia-kesehatan/pemisahan-kimia-dan-analisis/filtrasi-2/, diakses pada tanggal 10 juni 2013

⁶ Fitri Rahmawati, “Kajian Aktivitas Produk Olahan Jambu Biji Merah”, *Skripsi* (Bandung: Universitas Pendidikan Indonesia, 2012), hal. 28

pemanasan dengan suhu tinggi dapat merusak kandungan kimia dalam buah jeruk, misalnya vitamin C. Vitamin C mudah rusak selama pemrosesan dan penyimpanan. Laju perusakan meningkat karena kerja logam, terutama tembaga dan besi, serta kerja enzim.⁷ Dari hasil penguapan filtrat diperoleh sampel pekat. Sampel tersebut siap digunakan untuk tahapan selanjutnya.

B. Hasil Uji Kualitatif Fitokimia

Fitokimia atau kadang disebut fitonutrien, dalam arti luas adalah segala jenis zat kimia atau nutrien yang diturunkan dari sumber tumbuhan, termasuk sayuran dan buah-buahan. Fitokimia memiliki efek yang menguntungkan bagi kesehatan atau memiliki peran aktif bagi pencegahan penyakit.⁸

Uji kualitatif fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya metabolit sekunder yang terkandung dalam sari jeruk siam. Uji kualitatif fitokimia meliputi uji kualitatif senyawa flavonoid dan terpenoid pada sampel sari jeruk siam.

1. Uji Kualitatif Senyawa Flavonoid

Flavonoid atau bioflavonoid (berasal dari kata Latin *flavus* yang berarti kuning, warna flavonoid di alam) adalah kelas metabolit sekunder pada tanaman. Flavonoid merupakan pigmen

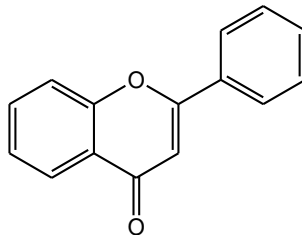
⁷ Jhon M Deman, *Kimia Makanan*, (Bandung: ITB, 1997), hal. 411

⁸ Wikipedia, "Fitokimia", dalam <http://id.wikipedia.org/wiki/fitokimia>, diakses pada tanggal 14 April 2013.

tumbuhan yang paling penting sebagai pewarna pada bunga seperti warna kuning, merah atau biru. Pigmentasi pada kelopak digunakan untuk menarik hewan sebagai proses penyerbukan pada bunga.

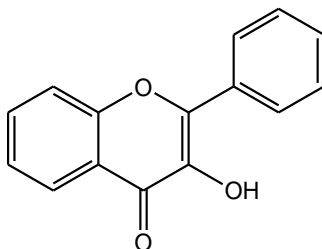
Flavonoid (khususnya katekin) adalah golongan yang paling umum dari senyawa polifenol yang digunakan untuk diet dan ditemukan diberbagai jenis tanaman. Flavonoid dikenal sebagai anti alergi, anti inflamasi, anti mikroba, anti kanker, anti diare dan juga anti virus seperti virus polio.

Flavonoid ditemukan diberbagai jenis jeruk, berry, bawang (terutama bawang merah), Peterseli, teh (terutama teh putih dan hijau), anggur merah, dan coklat hitam (dengan kadar *cocoa* 70%). Bioflavonoid pada jeruk yaitu hesperidin (glikosida dari flavanone hesperetin), quercitrin, rutin (dua glikosida flavonol dari quercetin), dan flavon tangeritin. Flavon, flavonol dan flavanon yang tersebar pada berbagai tumbuhan digambarkan pada Gambar 4.2, 4.3, dan 4.4 dibawah ini.⁹

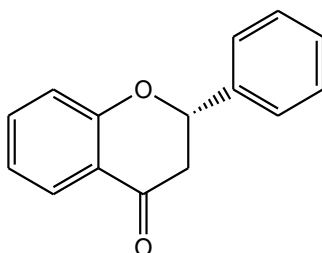


Gambar 4.2. Flavon (Luteolin, Apigenin, Tangeritin)

⁹ Wikipedia, “Flavonoid”, dalam <http://id.wikipedia.org/wiki/flavonoid>, diakses pada tanggal 14 April 2013.



Gambar 4.3. Flavonol (Quercetin, Kaempferol, Fisetin)

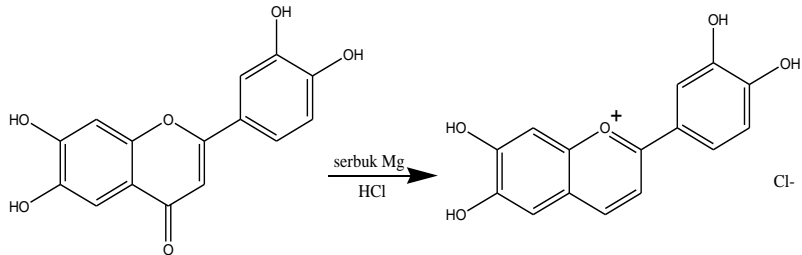


Gambar 4.4. Flavanon (Hesperidin, Naringenin, Eriodictyol)

Uji kualitatif senyawa flavonoid, dilakukan dengan cara mengambil sari jeruk siam sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes HCl pekat dan beberapa butir serbuk Mg. Dari percobaan yang telah dilakukan membuktikan bahwa dalam sampel yang diuji positif mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid. Hal ini ditunjukkan oleh perubahan warna sampel menjadi merah tua.

Penambahan HCl dalam uji kualitatif flavonoid berguna sebagai penghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan terganggu oleh H^+ dari asam, karena sifatnya yang elektrofilik. Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa.

Serbuk Mg menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga. Gambar 4.5. Dibawah menunjukkan adanya reaksi antara flavonoid dengan serbuk Mg dan HCl.¹⁰



Gambar 4.5. Reaksi Antara Flavonoid dengan Serbuk Mg dan HCl

2. Uji Kualitatif Senyawa Terpenoid

Terpenoid atau kadang-kadang disebut sebagai isoprenoid berasal dari lima karbon unit isoprena. Lipid dapat ditemukan di semua jenis makhluk hidup, dan merupakan golongan terbesar yang diproduksi di alam.

Terpenoid pada tanaman digunakan secara luas sebagai pemberi aroma. Terpenoid memiliki peranan dalam obat herbal tradisional dan berfungsi sebagai anti bakteri, anti neoplastik, dan fungsi-fungsi farmasi lainnya. Terpenoid berperan dalam aroma

¹⁰ Fatimah, "Karakteristik dan Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Ekstrak Madu Sumbawa" *Skripsi* (Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim, 2011), hal. 69-70

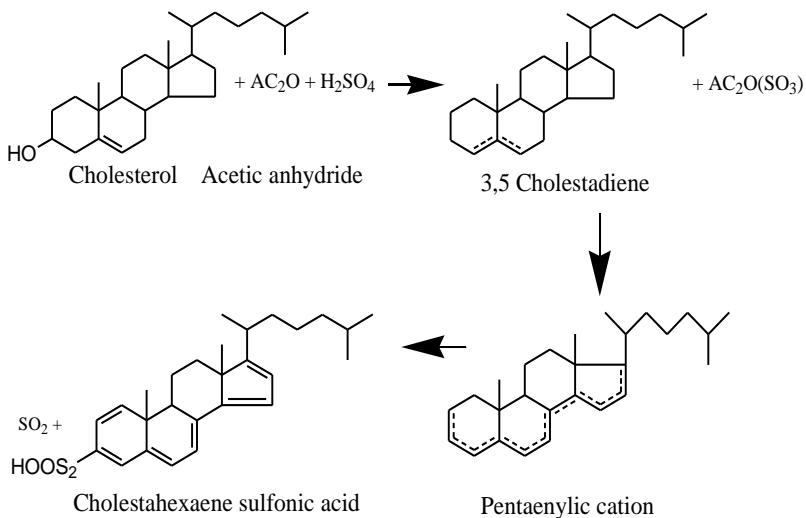
kayu putih, rasa kayu manis, cengkeh, jahe, pemberi warna kuning pada bunga matahari, dan warna merah pada tomat.¹¹

Uji kualitatif terpenoid dilakukan untuk mengetahui adanya senyawa aktif tersebut dalam sampel. Sampel yang berupa sari jeruk siam diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan 5 mL CH₃COOH, 2 mL kloroform, dan 3 mL H₂SO₄. Dari percobaan yang telah dilakukan menunjukkan hasil positif ditemukan adanya senyawa terpenoid dalam sampel, ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi merah kecoklatan.

Penambahan kloroform dilakukan untuk melarutkan senyawa triterpenoid yang terkandung dalam sampel karena senyawa triterpenoid dapat larut dengan baik dalam pelarut kloroform. Asam asetat digunakan untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Senyawa triterpenoid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat H₂SO₄ dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Perubahan warna ini disebabkan terjadinya reaksi oksidasi pada golongan terpenoid melalui pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi (senyawa pentainilik).¹² Gambar 4.6 dibawah ini menunjukkan adanya hubungan antara triterpenoid dengan Pereaksi Lieberman-Burchard.

¹¹ Wikipedia, "Terpenoid", dalam <http://id.wikipedia.org/wiki/terpenoid>, diakses pada tanggal 10 juni 2013

¹² Moh Zamroni, "Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Tanaman Anting-Anting (*Acalypha Indica* L.), *Skripsi* (Malang, 2011), hal. 80-81"



Gambar 4.6 Reaksi antara Senyawa Triterpenoid dengan Pereaksi Liebarman - Burchard

C. Uji Kualitatif Vitamin C

Vitamin C termasuk golongan vitamin antioksidan yang mampu menangkal berbagai radikal bebas. Vitamin C diperlukan untuk menjaga struktur kolagen yaitu sejenis protein yang menghubungkan semua jaringan serabut, kulit, urat, tulang rawan, dan jaringan lain di tubuh manusia. Struktur kolagen yang baik dapat menyembuhkan patah tulang, memar, pendarahan kecil, dan luka ringan. Sebagai antioksidan sifat vitamin C mampu menetralkan radikal bebas diseluruh tubuh. Vitamin C juga dapat meningkatkan pembuangan feses atau kotoran.

Kebutuhan vitamin C setiap orang berbeda-beda tergantung kebiasaan hidup masing-masing orang. Pada remaja, kebiasaan yang

berpengaruh diantaranya adalah merokok, minum kopi, minuman beralkohol, mengkonsumsi obat tertentu seperti obat anti kejang, antibiotik, obat tidur dan tetra siklin. Kebiasaan merokok menghilangkan 25% vitamin C dalam darah. Pemenuhan kebutuhan vitamin C bisa diperoleh dengan mengkonsumsi beraneka ragam buah dan sayuran, seperti jeruk, arbei, tomat, stroberi, asparagus, kol, susu, mentega, ikan, kentang, dan hati.¹³

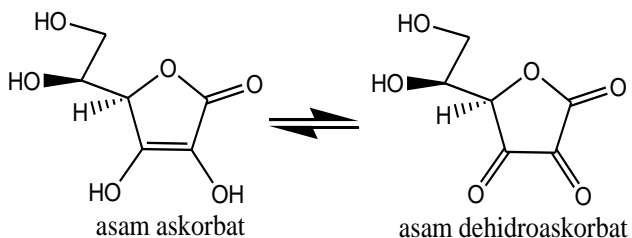
Untuk mengetahui adanya vitamin C yang terdapat dalam sari jeruk siam dilakukan uji kualitatif vitamin C yang didasarkan pada perubahan warna. Pereaksi yang digunakan dalam Uji kualitatif vitamin C menggunakan pereaksi benedict. Pertama-tama diambil 5 tetes sari jeruk siam, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan pereaksi benedict sebanyak 2 mL, dan terakhir dipanaskan selama 5 menit. Uji kualitatif vitamin C pada sari jeruk siam menunjukkan hasil positif dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau kekuningan dengan endapan merah bata.

Benedict merupakan larutan yang mengandung kuprisulfat, natrium karbonat, dan natrium sitrat. Adanya natrium karbonat dan natrium sitrat membuat pereaksi benedict bersifat asam lemah. Pemanasan bertujuan untuk mengubah kuprioksida yang berwarna hitam menjadi kuprioksida berwarna merah bata, dan dengan pemanasan reaksi akan berjalan lebih cepat karena energi aktivasi yang digunakan hanya sedikit. Vitamin C merupakan reduktor kuat

¹³ Wikipedia, "Vitamin C", dalam http://id.wikipedia.org/wiki/Vitamin_C, diakses pada tanggal 10 juni 2013

yang mampu mereduksi ion Cu^{2+} dari pereaksi benedict menjadi ion Cu^+ dengan membentuk endapan Cu_2O yang berwarna hijau kekuningan hingga merah bata.

Selain reagen benedict, identifikasi vitamin C bisa juga dilakukan dengan cara mencampurkan vitamin C, NaOH dan larutan FeSO_4 . Vitamin C bersifat asam yang larut dalam pelarut polar, sehingga untuk hasil yang terbaik digunakan NaOH yang bersifat basa. Sedangkan FeSO_4 bertindak sebagai agen pengoksidasi. Uji positif akan menghasilkan perubahan warna menjadi kuning hingga agak kecoklatan yang merupakan warna dari Dehidroascorbic acid.¹⁴ Asam askorbat merupakan bentuk tereduksi dari vitamin C, sedangkan asam dehidro askorbat adalah bentuk teroksidasi dari vitamin C.¹⁵ Gambar 4.7 menunjukkan reaksi oksidasi vitamin C.



Gambar 4.7 Reaksi oksidasi vitamin C

¹⁴ Ratih Rizqi Nirwana, "Materi Praktikum Biokimia", (Semarang: Program Strata I IAIN Walisongo Semarang, 2013), hlm. 21

¹⁵ Wikipedia, "Redoks", dalam <http://id.m.wikipedia.org/wiki/redoks>, diakses pada tanggal 15 November 2013.

D. Uji Aktivitas Antioksidan Pada Sampel

1. Kurva Kalibrasi

Sebelum dilakukan uji aktivitas antioksidan pada sari jeruk siam, pertama-tama dibuat kurva standar larutan DPPH. Kurva antara absorbansi sebagai ordinat dan panjang gelombang sebagai absis akan menghasilkan suatu spektrum absorpsi. Kurva kalibrasi atau kurva standar diperoleh dengan mengukur absorbansi dari sederet konsentrasi larutan standar. Untuk zat atau senyawa yang mengikuti hukum Beer, kurva antara absorbansi dengan konsentrasi merupakan garis lurus.¹⁶ Caranya diambil sebanyak 5 mg DPPH dimasukkan kedalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dalam pelarut metanol.

Larutan DPPH yang dibuat memiliki konsentrasi 100 ppm, kemudian diambil sejumlah larutan DPPH tersebut dan dilakukan pengenceran dalam labu ukur 10 mL hingga didapatkan variasi konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 517 nm.

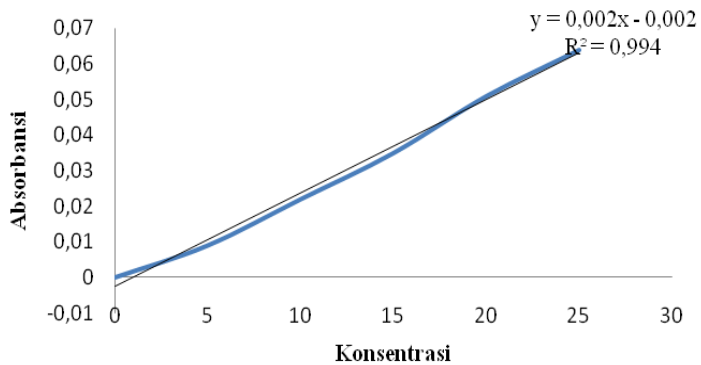
Dari hasil pengukuran dengan spektroskopi UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm didapatkan nilai absorbansi dari masing-masing konsentrasi yang ditunjukkan dalam Tabel 4.1 berikut ini.

¹⁶ Maria Bintang, *Biokimia Teknik Penelitian*, (Jakarta: Erlangga, 2010), hal. 195

Tabel 4.1. Nilai Absorbansi Larutan Standar

No.	Konsentrasi	Absorbansi
1.	0	0
2.	5	0,009
3.	10	0,022
4.	15	0,035
5.	20	0,051
6.	25	0,064

Berdasarkan penentuan absorbansi larutan standar tersebut dapat digambarkan kurva kalibrasi yang bertujuan untuk menguji linearitas antara konsentrasi dengan absorbansi larutan DPPH yang dapat ditunjukkan pada Gambar 4.8 dibawah ini:



Gambar 4.8 Kurva Kalibrasi sebagai Penguji Linearitas pada Sampel

Dari kurva kalibrasi diperoleh hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi, didapatkan persamaan $y = 0,002x - 0,002$ dan harga linearitas sebesar 0,994. Besarnya harga linearitas tersebut mendekati 1 (satu), sehingga dapat dikatakan absorbansi merupakan fungsi yang besarnya berbanding lurus dengan konsentrasi.¹⁷

2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan pada Sari Jeruk Siam

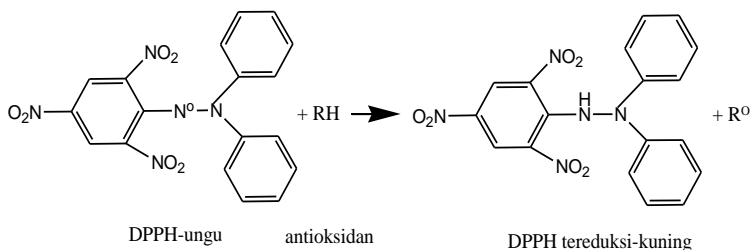
Seperti yang telah disebutkan bahwa penelitian ini menggunakan metode DPPH dalam menguji aktivitas antioksidan pada sari jeruk siam. Metode DPPH adalah suatu metode sederhana yang dikembangkan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari suatu bahan pangan menggunakan radikal DPPH (*2,2 - diphenyl -1- picrylhydrazyl*). Uji DPPH adalah suatu metode kolorimetri yang efektif dan cepat untuk memperkirakan aktivitas antiradikal.

Radikal DPPH adalah suatu senyawa organik yang mengandung nitrogen tidak stabil dengan absorbansi kuat pada $\lambda = 517$ nm dan berwarna ungu gelap. Setelah bereaksi dengan senyawa antioksidan, DPPH tersebut akan tereduksi dan warnanya akan berubah menjadi kuning. Hal ini menunjukkan bahwa semakin kuat suatu senyawa antioksidan

¹⁷ Wulan Nur Aprilianti, Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah dan Beras Hitam dan Produk Olahannya Berupa Nasi. *Skripsi*, (Bandung: Program Strata Satu Universitas Pendidikan Indonesia, 2010), hlm. 37

dalam mendonorkan atom hidrogen maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya.¹⁸

Reaksi dari suatu radikal bebas DPPH dengan antioksidan diperlihatkan pada Gambar 4.9 dibawah ini.



Gambar 4.9. Reaksi DPPH dengan Senyawa Antioksidan

Sebelum dilakukan pengukuran terhadap aktivitas antioksidan pada sampel, pertama-tama dilakukan terlebih dahulu pengenceran pada 1 mg DPPH dengan cara menempatkan DPPH kedalam labu ukur 50 mL kemudian diencerkan dengan metanol hingga tanda batas. Sehingga dihasilkan larutan DPPH dengan konsentrasi 20 ppm.

Pengenceran pada serbuk DPPH harus dilakukan agar jarak antar molekul analit tidak terlalu dekat, karena jika jaraknya cukup dekat dapat mempengaruhi distribusi muatan, sehingga mengubah cara molekul melakukan serapan dan

¹⁸ Wulan Nur Aprilianti, Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Beras Merah dan Beras Hitam dan Produk Olahannya Berupa Nasi. *Skripsi*, (Bandung: Program Starta Satu Universitas Pendidikan Indonesia, 2010), hlm. 38

terjadi penyimpangan hukum Lambert-Beer. Bagian sinar yang diserap tergantung pada seberapa banyak molekul yang berinteraksi dengan sinar. Jika zat warna tersebut berupa larutan pekat, maka akan diperoleh absorbansi yang sangat tinggi karena ada banyak molekul yang berinteraksi dengan sinar. Namun, jika larutan tersebut sangat encer, akan sangat sulit untuk melihat warnanya sehingga absorbansinya menjadi sangat rendah.¹⁹

Selanjutnya pengujian aktivitas antioksidan dalam sari jeruk siam, dilakukan dengan mereaksikan sari jeruk siam sebanyak 4 mL dengan 2 mL DPPH dengan konsentrasi 20 ppm. Kemudian campuran diinkubasi selama 30 menit, agar reaksi antara larutan sampel dengan larutan DPPH berlangsung sempurna sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, didapatkan harga absorbansi DPPH kontrol 0,079 dan absorbansi sampel yang ditunjukkan pada Tabel 4.2 berikut ini:

¹⁹ Clark, Jim, “Hukum Beer-Lambert”, dalam <http://Chem-is-try.org>. [Materi-kimia/instrumen-analisis/spektrum-serapan-ultraviolet-tampak-uv-vis /hukum beer lambert](#), Diakses 13 juni 2013

Tabel. 4.2 Absorbansi Sampel

No.	Absorbansi
1.	0,030
2.	0,028
Rata-rata	0,029

Adanya aktivitas antioksidan pada sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang direaksikan dengan sari jeruk siam. Larutan yang semula berwarna ungu berubah warna menjadi kuning pucat. Hal tersebut terjadi karena semua radikal bebas DPPH menjadi berpasangan ketika terjadinya reaksi antara larutan DPPH dengan zat antioksidan dalam sampel yang dapat mendonorkan atom hidrogen, sehingga warna ungu pada larutan DPPH menjadi pudar.

Rumus persen aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs DPPH kontrol} - \text{Abs DPPH sisa}}{\text{Abs DPPH Kontrol}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Aktivitas antioksidan} &= \frac{0,079 - 0,028}{0,079} \times 100\% \\ &= 63,3\% \end{aligned}$$

Aktivitas antioksidan dalam sampel dinyatakan dengan pengurangan nilai absorbansi DPPH kontrol (absorbansi DPPH sebelum direaksikan dengan sampel) terhadap nilai absorbansi radikal DPPH sisa (absorbansi

DPPH setelah direaksikan dengan sampel). Dari rumus aktivitas antioksidan diatas maka dapat diketahui bahwa harga aktivitas antioksidan pada sampel sari jeruk siam adalah 63,3%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa dalam jeruk siam dapat mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif sebanyak 63,3%.