

BAB IV

DESKRIPSI DAN ANALISA DATA

A. Deskripsi Data

1. Preparasi Sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) dan daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL) Merr et. Perry) varietas delima yang diperoleh dari pekarangan rumah di Desa Wilalung Kecamatan Gajah Kabupaten Demak. Salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) dan jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr et. Perry) merupakan tumbuhan asli Indonesia yang mudah tumbuh di pekarangan rumah. Daun salam (*Syzygium polyanthum*(Wight) Walp) mengandung senyawa aktif seperti minyak atsiri, tanin, flavonoid dan eugenol yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti jamur. Daun salam dikenal di masyarakat sebagai penyedap masakan sekaligus sebagai tanaman obat yang mampu mengobati hipertensi, maag, kencing manis dan diare.¹

Penelitian sebelumnya diketahui bahwa daun jambu air mengandung senyawa aktif seteroid, fenolik dan triterpenoid. Daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr et.

¹ Ha Manan, Daun Salam untuk Diabet, Maag dan Hipertensi, (<http://www.suaramerdeka.com/harian/0208/31/ragam3.htm>), diakses 20 Desember 2013 pukul 20.15 WIB

Perry) dapat dimanfaatkan sebagai *astringent*, untuk mengobati demam dan menghentikan diare, diabetes, batuk dan sakit kepala. Selain itu, bubuk daun digunakan untuk lidah pecah-pecah dan jus daun digunakan dalam mandi dan lotion.²

Tahap pertama yaitu preparasi sampel, daun salam dan daun jambu air dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Daun salam dan daun jambu air menjadi kering dalam jangka waktu 7 hari. Pengeringan daun salam dan daun jambu air bertujuan untuk menghilangkan kadar air yang banyak terkandung dalam daun segar. Pengeringan merupakan proses pengurangan kadar air sampai batas terbaik, yaitu 8-10%, karena pada tingkat kadar air tersebut, sampel terhindar dari pencemaran yang disebabkan oleh jamur, bakteri dan insektisida.³ Pengeringan dilakukan pada suhu kamar agar senyawa-senyawa metabolit sekunder yang ada pada daun tidak rusak akibat suhu yang tinggi.

Daun salam dan daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr et. Perry) yang telah kering dihaluskan dengan cara diblender tanpa pelarut. Penghalusan daun menjadi serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan

² Tina Pater,dkk, “*Syzygium Samarangense: A Review On Morphology, Phytochemistry & Pharmacological Aspects*”, *Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research* (Issue 4, Vol. 1, 2011), hlm. 157-156

³ Gerlinda Ridwina, “Perbandingan Metode Pengukuran Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol dan Minyak Atsiri Lempuyang Gajah”, *Skripsi*, (Bogor : Institut Pertanian Bogor, 2008), hlm. 5

sehingga difusi sampel dengan pelarut pada saat ekstraksi dapat berjalan dengan optimal.

Sampel yang telah halus dibawa ke laboratorium kimia Fakultas Tarbiyah dan Keguruan. Sampel disimpan di dalam wadah kedap udara dan kedap cahaya untuk menjaga mutu sampel dan mencegah kerusakan.

2. Ekstraksi Sampel

Daun salam (*Syzygium polyantum* (Wight) Walp) dan daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr et. Perry) diekstraksi dengan metode maserasi. Metode ini dipilih karena ekstraksi cara dingin dapat mencegah terurainya metabolit yang tidak tahan pemanasan. Ekstraksi dilakukan secara bertingkat dengan pelarut n-heksana dan metanol. Pelarut yang pertama kali digunakan adalah n-heksana yang bersifat non polar dengan tujuan untuk menghilangkan lemak dan mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non polar seperti asam lemak, sterol, kumarin dan beberapa terpenoid. Metanol yang bersifat polar digunakan untuk mengekstrak senyawa polar seperti flavonoid, glikosida, tannin dan beberapa alkaloid.⁴

Tahap pertama, sampel daun salam (*Syzygium polyantum* (Wight) Walp) sebanyak 75 gram dimaserasi

⁴ J.B.Harbone, Metode Fitokimia penuntun cara modern menganalisis tumbuhan, (Bandung : Penerbit ITB, 2006), hlm. 71

dengan n-heksana sebanyak 500 mL selama 24 jam dan diaduk beberapa kali. Hal ini dilakukan agar pelarut yang digunakan berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya dan larutan melewati dinding sel serta bercampur dengan cairan di sekitarnya sehingga terbentuk kesetimbangan.⁵ Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali dan filtrat yang diperoleh ditampung dan diuapkan dengan penguap putar pada suhu 50⁰C hingga n-heksana menguap seluruhnya. Penggunaan vakum memungkinkan pelarut dapat menguap pada suhu rendah sehingga senyawa yang terkandung dalam ekstrak tidak rusak. Ekstrak n-heksana selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 50⁰C.

Residu dari maserasi n-heksana dikeringkan dan dimaserasi lagi menggunakan pelarut metanol sebanyak 500 mL selama 24 jam dan diaduk beberapa kali. Hal ini dilakukan agar pelarut yang digunakan berdifusi ke dalam sel untuk melarutkan senyawa yang terkandung didalamnya dan larutan melewati dinding sel serta bercampur dengan cairan di sekitarnya sehingga terbentuk kesetimbangan.⁶ Ekstraksi dilakukan sebanyak 2 kali dan filtrat yang diperoleh ditampung

⁵ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Menggunakan *Artemia salina* Leach dari Fraksi Aktif Ekstrak Metanol Daun Asa Tungga (*Lithocarpus Celebicus* (Miq) Rehder), *Skripsi*, (Jakarta: Universitas Indonesia, 2012), hlm.50

⁶ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas, ..., hlm.50

dan diuapkan dengan penguap putar pada suhu 50⁰ C hingga metanol menguap seluruhnya. Penggunaan vakum memungkinkan pelarut dapat menguap pada suhu rendah sehingga senyawa yang terkandung dalam ekstrak tidak rusak. Ekstrak metanol selanjutnya dikeringkan dalam oven dengan suhu 50⁰ C.

Ekstraksi daun jambu air (*Syzygium samarangense* (BL.) Merr et. Perry) dilakukan dengan cara yang sama seperti pada daun salam. Hasil akhir diperoleh 4 ekstrak sampel, yaitu ekstrak n-heksana daun salam, ekstrak metanol daun salam, ekstrak n-heksana daun jambu air dan ekstrak metanol daun jambu air. Hasil kualitatif ekstraksi dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil ekstraksi secara kualitatif

No	Sampel	Pelarut	Warna Ekstrak
1	Daun Salam	n-Heksana	Coklat kekuningan
2		Metanol	Hijau Pekat
3	Daun Jambu Air	n-Heksana	Coklat Kekuningan
4		Metanol	Hijau Pekat

3. Uji Aktivitas Antioksidan

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh. Keberadaan senyawa antioksidan ini dalam suatu bahan dapat dideteksi dengan melakukan uji aktivitas antioksidan. Uji aktivitas antioksidan

pada ekstrak kasar daun salam dan daun jambu air dilakukan dengan menggunakan metode uji DPPH.

Metode uji DPPH merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk memperkirakan efisiensi kinerja dari substansi yang berperan sebagai antioksidan. Metode pengujian ini berdasarkan pada kemampuan substansi antioksidan tersebut dalam menetralkan radikal bebas. Radikal bebas yang digunakan adalah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH).

Radikal bebas DPPH merupakan radikal sintetik yang stabil pada suhu kamar dan larut dalam pelarut polar seperti metanol. Sifat stabil ini dikarenakan radikal bebas ini memiliki satu elektron yang didelokalisasi dari molekul utuhnya, sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas lain. Delokalisasi ini akan memberikan sebuah warna ungu gelap dengan absorbansi maksimum pada 517 nm dalam larutan etanol ataupun metanol.⁷

Metode uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH dipilih karena metode ini sederhana, mudah, cepat, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel, akan tetapi jumlah pelarut pengencer yang diperlukan dalam pengujian ini cukup banyak. Pelarut yang digunakan adalah

⁷ Philip Molyneux, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakar J. Sci. Technol.*, (Vol. 26 No. 2 Mar.-Apr. 2004), hlm. 212

metanol. metanol dipilih sebagai pelarut karena metanol dapat melarutkan kristal DPPH dan juga memiliki sifat yang dapat melarutkan komponen non polar di dalamnya.⁸ Hal ini mengingat ketiga ekstrak yang diuji memiliki tingkat kepolaran yang berbeda-beda.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan spektrofotometer uv-vis. Larutan pembanding yang digunakan adalah Vitamin C. Hasil uji dilaporkan sebagai IC₅₀. IC₅₀ merupakan salah satu parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari pengujian DPPH. Nilai IC₅₀ ini dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang dapat menyebabkan berkurangnya 50% aktivitas DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi.⁹

Langkah pertama yang dilakukan pada uji antioksidan adalah pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 µg/mL, perhitungan dapat dilihat pada Lampiran.2 . Larutan DPPH 100 µg/mL diambil sebanyak 1 mL dan ditambah 3 mL metanol *p.a* dan diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 30 menit, kemudian dilakukan optimasi panjang gelombang DPPH. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang optimum karena kepekaannya maksimal sehingga hukum Lambert-Beer akan terpenuhi. Panjang gelombang optimum dari DPPH

⁸ Philip Molyneux, The use of the stable free radical,...hlm. 215

⁹ Philip Molyneux, The use of the stable free radical,...hlm. 214

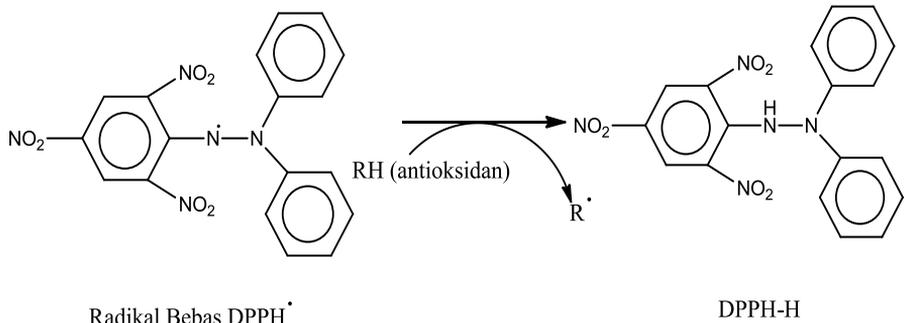
berdasarkan penelusuran literatur berkisar antara 515-520 nm. Optimasi panjang gelombang dilakukan karena peralatan yang digunakan berbeda dengan literatur yang dapat menyebabkan perbedaan serapan maksimum. Perbedaan panjang gelombang diatas 320 nm tidak lebih dari ± 2 nm dari panjang gelombang yang ditentukan.¹⁰ Hasil pengukuran absorpsi optimum DPPH diperoleh pada panjang gelombang 515 nm.

B. Analisis Data

Pengukuran absorpsi beberapa sampel dilakukan pada konsentrasi 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm dan 100 ppm dengan pengulangan 2 kali. Data hasil pengukuran absorpsi masing-masing sampel dapat di lihat pada Lampiran.3.

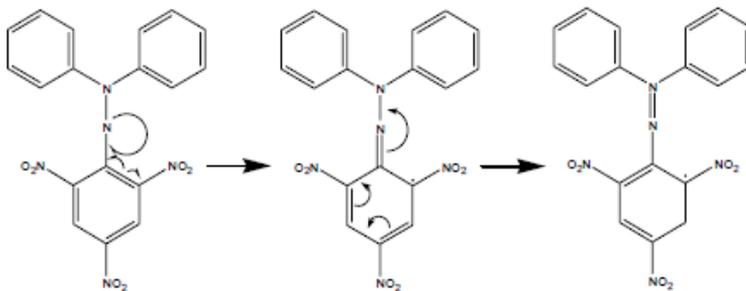
Suatu senyawa dapat dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya pada radikal DPPH yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning pucat. Reaksi yang terjadi antara DPPH dan senyawa antioksidan adalah seperti dalam Gambar 4.1.

¹⁰ Dewi Murni, Isolasi Uji Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas,...hlm.58



Gambar 4.1 Reaksi antara DPPH• dengan antioksidan membentuk DPPH-H

Penangkapan atom hidrogen mengakibatkan ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH berkurang sehingga terjadi penurunan intensitas warna dan penurunan absorbansi. Hal ini dapat terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan yang menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron tersebut untuk beresonansi. Resonansi senyawa DPPH dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Resonansi pada struktur DPPH

Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH. Hasil aktivitas antioksidan dari ekstrak kasar beberapa sampel dibandingkan dengan aktivitas antioksidan Vitamin C. Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena Vitamin C merupakan salah satu antioksidan yang umum digunakan. Data hasil pengukuran aktivitas antioksidan dari beberapa sampel dapat dilihat pada Tabel 4.2 berikut ini.

Tabel 4.2. Persen inhibisi dan IC_{50} dari ekstrak daun salam, daun jambu air dan Vitamin C

No	Konsentrasi (ppm)	Daun Salam				Daun jambu Air				Vitamin C	
		N-heksana		Metanol		N-heksana		Metanol		%P ₁	%P ₂
		%P ₁	%P ₂								
1	25	1.03	0.51	3.60	4.37	1.80	1.28	9.70	5.45	56.67	54.84
2	50	20.82	18.17	20.82	21.08	5.65	4.62	34.84	31.81	86.67	85.45
3	75	43.70	43.19	61.70	63.75	8.74	9.76	66.67	76.96	-	-
4	100	47.04	46.53	73.52	73.00	12.59	13.11	90.91	89.70	-	-
IC_{50}		3.86	3.90	2.90	2.88	14.56	13.04	2.48	2.47	0.78	0.84
Rata-rata IC_{50}		3.88		2.89		13.80		2.47		0.81	

Keterangan : %P₁= persentase inhibisi pengujian ke-1
 %P₂= persentase inhibisi pengujian ke-2

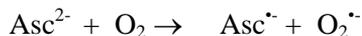
Tabel 4.2 menunjukkan bahwa rata-rata nilai IC_{50} berturut-turut dari yang terkecil yaitu, Vitamin C (0.81 $\mu\text{g/mL}$), ekstrak metanol daun jambu air (2.475 $\mu\text{g/mL}$), ekstrak metanol daun salam (2.89 $\mu\text{g/mL}$), ekstrak n-heksana daun salam (3.88 $\mu\text{g/mL}$) dan ekstrak n-heksana daun jambu air (13.8 $\mu\text{g/mL}$).

Semakin kecil nilai IC_{50} berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi. Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, kuat apabila

nilai IC_{50} antara 50-100 $\mu\text{g/mL}$, sedang apabila nilai IC_{50} berkisar antara 100-150 $\mu\text{g/mL}$, dan lemah apabila nilai IC_{50} berkisar antara 150-200 $\mu\text{g/mL}$.¹¹

Sampel yang diuji memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$, sehingga dapat disimpulkan bahwa sampel tersebut memiliki potensi antioksidan yang sangat kuat. Antioksidan pada daun salam dan daun jambu jika dibandingkan dengan Vitamin C, Antioksidan pada Vitamin C lebih kuat, akan tetapi Vitamin C bersifat antioksidan pada konsentrasi kurang dari 50 ppm. Pada konsentrasi lebih dari 50 ppm, Vitamin C bersifat pro-oksidan. Radikal askorbat yang terbentuk setelah menetralkan radikal bebas, akan mengalami transfer elektron dan membentuk askorbat dianion. Selanjutnya setelah mengalami auto-oksidasi, askorbat dianion tersebut akan menjadi radikal askorbat dan radikal anion superoksida.¹²

Reaksi kimianya sebagai berikut :



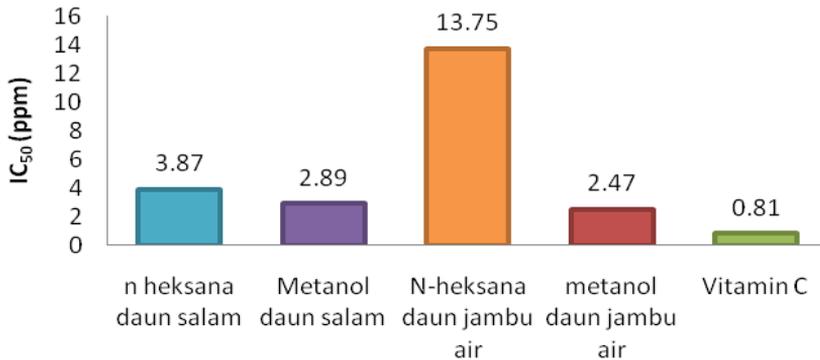
Reaksi tersebut menunjukkan bahwa vitamin C menghasilkan anion superoksida meskipun jumlahnya sangat rendah. Pada konsentrasi yang semakin tinggi maka anion

¹¹ Azwin Apriandi, Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif,...,hlm.43

¹² Dedy Winarto, Pemanfaatan Vitamin C dan E Sebagai Antioksidan Untuk Memperbaiki Kuantitas dan Kualitas Spermatozoa (16 Maret 2013),dalam (www.universitas Muhammadiyah Purworejo/Artikel), diakses pada tanggal 18 Agustus 2014 Pukul 10.16.

superoksida yang dihasilkan semakin meningkat sehingga bersifat pro oksidan.

Nilai aktivitas antioksidan Sampel dan Vitamin C dapat dilihat pada Gambar 4.3.



*Keterangan: Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya.

Gambar 4.1. Nilai IC₅₀ beberapa sampel

Nilai IC₅₀ tertinggi pada sampel adalah pada ekstrak metanol daun jambu air. Nilai aktivitas antioksidan pada pelarut metanol lebih tinggi dibanding dengan pelarut n-heksana karena metabolit sekunder cenderung larut dalam pelarut polar seperti senyawa flavonoid, fenolik. Metabolit sekunder yang larut dalam senyawa non polar adalah senyawa terpen.

Perbedaan hasil dari nilai IC₅₀ daun salam dan daun jambu dianalisis secara statistik menggunakan uji ANAVA dua jalur dengan SPSS. Hasil uji ANAVA menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ daun salam dan daun jambu air berbeda secara signifikan (p

<0.05). Data hasil uji ANAVA dapat dilihat pada Tabel 4.3 berikut ini.

Tabel 4.3. Hasil Uji ANAVA

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.	F _{tabel}
Koreksi Model	174.408 ^a	3	58.136	201.119	.000	6.59
Pelarut	75.830	1	75.830	262.329	.000	7.71
Sampel	45.173	1	45.173	156.272	.000	7.71
Pelarut * Sampel	53.406	1	53.406	184.756	.000	7.71
Error	1.156	4	.289			
Total	441.100	8				
Koreksi Total	175.564	7				

a. R Squared = .993 (Adjusted R Squared = .988)

Hasil koreksi model menunjukkan bahwa signifikansi < 0.05 dan $F_{hit} > F_{tabel}$, maka dapat disimpulkan faktor sampel dan faktor pelarut mempengaruhi nilai IC_{50} dan model valid dengan korelasi yang kuat, terbukti dari nilai R^2 yang mendekati 1.

Analisa pada pelarut menunjukkan bahwa signifikansi < 0.05 dan $F_{hit} > F_{tabel}$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan antara pelarut n-heksana dan metanol. Nilai IC_{50} pelarut n-heksana lebih tinggi dibanding pada pelarut metanol. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan terbesar terdapat pada pelarut metanol, karena komponen bioaktif yang bersifat antioksidan yang terdapat pada daun salam dan daun jambu air cenderung bersifat polar. Pelarut metanol memiliki berat molekul yang rendah sehingga memudahkan pembentukan

ikatan hidrogen dan air pada jaringan sampel, sehingga banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder.

Analisa pada sampel menunjukkan bahwa signifikansi < 0.05 dan $F_{hit} > F_{tabel}$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan antara aktivitas antioksidan daun salam dan daun jambu air. Secara keseluruhan aktivitas antioksidan pada daun salam lebih baik dibanding pada daun jambu air.

Analisa interaksi antara sampel dengan pelarut menunjukkan bahwa signifikansi < 0.05 dan $F_{hit} > F_{tabel}$, maka dapat disimpulkan bahwa terdapat interaksi yang signifikan antara sampel dan pelarut yang digunakan. Jadi jenis pelarut yang digunakan mempunyai pengaruh yang berbeda pada aktivitas antioksidan daun salam dan daun jambu air.

Data eror dari Tabel 4.3 menunjukkan nilai kemungkinan kesalahan, semakin kecil nilai mean kuadrat maka data semakin baik. Data ini, memiliki nilai eror sebesar 0.289.

Aktivitas antioksidan yang paling tinggi, apabila dilihat satu persatu adalah pada ekstrak metanol daun jambu air yaitu sebesar $2.47 \mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} dari paling rendah ke paling tinggi secara berturut-turut adalah Vitamin C, ekstrak metanol daun jambu air, ekstrak metanol daun salam, ekstrak n-heksana daun salam dan ekstrak n-heksana daun jambu air sebesar $0.81 \mu\text{g/mL}$; $2.47 \mu\text{g/mL}$; $2.89 \mu\text{g/mL}$; $3.87 \mu\text{g/mL}$; $13.75 \mu\text{g/mL}$.

C. Keterbatasan Penelitian

Penelitian yang dilakukan, tentunya memiliki banyak keterbatasan. Keterbatasan penelitian ini diantaranya:

1. Keterbatasan Objek Penelitian

Penelitian ini hanya terbatas pada aktivitas antioksidan pada ekstrak kasar daun salam dan daun jambu air. Perlu dilakukan pengujian fitokimia dan pemisahan komponen bioaktifnya sehingga menjadi bahan senyawa murni.

2. Keterbatasan Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat dan waktu juga mempengaruhi pelaksanaan penelitian. Tempat yang digunakan yaitu Laboratorium Kimia IAIN Walisongo Semarang dan Laboratorium Kimia Universitas Semarang yang masih terbatas dalam alat dan bahan yang digunakan. Keterbatasan peralatan laboratorium memungkinkan hasil berbeda bila dilakukan pengujian kembali di tempat lain.

3. Keterbatasan Biaya

Biaya merupakan salah satu faktor penunjang penelitian yang dilakukan oleh peneliti. Penelitian ini memerlukan biaya yang tidak sedikit sehingga apabila biaya minim bisa menjadi penghambat untuk proses penelitian.