

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Fenolik merupakan salah satu kelompok metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman yang terdistribusi luas di alam. Fenolik memiliki beberapa subkelas seperti fenolik sederhana dan polifenol, fenolik sederhana seperti asam fenolat dan kumarin, polifenol seperti flavonoid, tanin, stilbene, dan lignan. Fenolik memiliki beragam bioaktivitas namun yang paling menarik adalah adanya aktifitas antioksidan. Aktifitas antioksidan ini berkaitan dengan adanya cincin aromatis yang mengikat gugus hidroksil yang dapat menjadi donor atau hidrogen pada radikal bebas. Mekanisme ini membuat fenolik bisa menjadi penangkal radikal bebas dan oksidan-oksidan yang ada di lingkungan.

Tren penelitian tentang antioksidan saat ini semakin meningkat, hal ini disebabkan karena antioksidan diyakini dapat mengatasi keadaan stres oksidatif. Stres oksidatif adalah suatu keadaan dimana kadar antioksidan dan radikal bebas di dalam tubuh tidak seimbang karena jumlah radikal bebas yang berlebihan. Hal ini dapat memicu terjadinya berbagai macam penyakit terutama penyakit kronik dan degeneratif yang berkaitan dengan usia. Saat ini pencarian antioksidan alami sangat diminati untuk digunakan sebagai pengganti antioksidan sintesis yang memiliki potensi karsinogen. Antioksidan alami dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan yang mengandung komponen fenolik.

Melastoma malabathricum L atau lebih dikenal dengan daun senduduk merupakan tanaman yang tumbuh dan terdistribusi luas di daerah Sumatera Barat. Tanaman ini banyak digunakan secara tradisional sebagai obat luka, sakit perut, obat batuk, dan sakit gigi. Daun senduduk dilaporkan mengandung beberapa

senyawa fenolik yaitu asam klorogenat (CGA), kaempferol, autosianidin, katekin, epikatekin, phlorizin, dan tanin terkondensasi (CT). Keberagaman komponen kimia pada tanaman ini menunjukkan potensi untuk digunakan sebagai bahan baku untuk obat maupun kosmetika. Penelitian oleh Asep dkk, 2018 melaporkan kadar fenolat total dari daun senduduk sebesar 17,46% (ekstrak total), 23% (fraksi metanol air), 19% (fraksi etil asetat), dimana kadar fenolik pada daun lebih tinggi dibandingkan batangnya.

Fenolik dalam tumbuhan berada dalam bentuk ikatan kompleks dan polimer, dimer, ester, yang akan mempengaruhi aktivitas dan pelarutannya pada saat ekstraksi. Beberapa prosedur pemisahan fenolik melibatkan hidrolisis baik asam maupun basa. Menurut penelitian hidrolisis asam lebih baik dari pada hidrolisis basa. Proses hidrolisis dapat melepaskan fenolik dari bentuk ikatan kompleks ataupun ikatan polimernya di alam, sehingga dapat meningkatkan konsentrasi fenolat tersebut.

Berdasarkan informasi tersebut, peneliti tertarik melakukan evaluasi terhadap kadar fenolat total dan aktivitas antioksidan dari ekstrak daun senduduk yang dihidrolisis dengan asam klorida. Ekstrak daun senduduk yang digunakan dipisahkan terlebih dahulu dari fasa nonpolarnya yang dianggap sebagai pengotiv karena mengandung zat seperti lemak, lilin dan senyawa lipid lainnya. Asam klorida yang digunakan pada hidrolisis divariasikan dalam beberapa konsentrasi, Pengukuran fenolik serta antioksidan menggunakan instrumen spektrofotometer UV-VIS.

1.2 Rumusan masalah

1. Berapakah kadar fenolat total dari hasil hidrolisis asam terhadap ekstrak daun senduduk
2. Berapakah aktivitas antioksidan dari hasil hidrolisis asam terhadap ekstrak daun senduduk

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk memperoleh informasi kadar fenolik total dari hasil hidrolisis asam terhadap ekstrak daun senduduk
2. untuk memperoleh informasi kadar antioksidan dari hasil hidrolisis asam terhadap ekstrak daun senduduk

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi yang terdapat dari kandungan kadar fenolik total dan antioksidan
2. Menjadi sumber informasi bagi masyarakat tentang potensi daun senduduk sebagai bahan-bahan obat atau kosmetik

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman senduduk (*Melastoma malabathricum* L)

2.1.1 Klasifikasi tumbuhan

Menurut Backer dan Bakhuizen (1968) dalam Liana (2010), klasifikasi ilmiah tanaman senduduk adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Devisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospremae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Myrtales
Famili	: Melastomataceae
Genus	: Melastoma
Spesies	: <i>Melastoma malabathricum</i> L



Sumber: Berita Biologi

Gambar 1: Daun senggani/senduduk (*Melastoma malabathricum* L).

2.1.2 Morfologi dan distribusi

Tumbuhan senduduk (*Melastoma malabathricum* L.) tumbuh liar pada tempat-tempat yang mendapat cukup sinar matahari, seperti di lereng gunung, lapangan yang tidak terlalu gersang, atau di daerah objek wisata sebagai tanaman hias dan dapat tumbuh sampai ketinggian 1.650 m di atas permukaan air laut. Perdu, tegak, tinggi 0,5 – 4 m, banyak bercabang, bersisik, berambut. Daun tunggal, bertangkai, letak berhadapan silang. Helai daun bundar telur memanjang sampai lonjong, ujung lancip, pangkal membulat, tepi rata, permukaan berambut pendek yang jarang dan kaku sehingga teraba kasar. Berbunga majemuk keluar di ujung cabang, warna ungu kemerahan. Buah masak akan merekah dan terbagi dalam beberapa bagian, warnanya ungu tua kemerahan. Biji kecil kecil warnanya coklat. Buahnya dapat dimakan, sedangkan daun muda dapat dimakan sebagai lalap atau disayur.

Pada dasarnya seluruh bagian tanaman ini juga telah lama digunakan di dunia sebagai pengobatan alami manusia. *Melastoma malabathricum* L. termasuk tanaman yang kaya dengan senyawa flavonoid dan tanaman ini merupakan tanaman yang dapat dijadikan sebagai tanaman antimikroba. Sementara peran lain yang tak diragukan dari flavonoid adalah fungsinya dalam melindungi tanaman terhadap serangan mikroba sebagaimana juga akumulasi sebagai phytoalexins dalam menanggapi serangan mikroba. Selain itu beberapa flavonoid baru-baru ini yang didokumentasikan menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap beberapa strain bakteri.

2.1.3 Khasiat Tradisional *Melastoma malabathricum* L

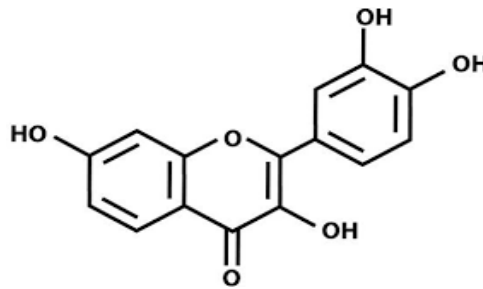
Melastoma malabathricum L termasuk famili Melastomataceae adalah salah satu tumbuhan berkhasiat obat yang banyak dimanfaatkan masyarakat di Asia. Masyarakat di Indonesia dan Malaysia, menggunakan daun dan akar dari tumbuhan ini untuk mengobati penyakit diare, mengatasi gangguan pencernaan, disentri, keputihan (leukorea), wasir, luka, sakit gigi dan sariawan. Masyarakat di Kabupaten Sintang, Kalimantan Barat, juga menggunakan daun ini sebagai obat penurun demam dengan cara meminum air rebusan daun, Masyarakat di Desa Lero Kecamatan Sindue, Sulawesi Tengah memanfaatkan tumbuhan ini secara tradisional sebagai obat diare terutama bagian daunnya.

2.1.4 Kandungan *Melastoma malabathricum* L

Senduduk memiliki berbagai kandungan kimia, terutama pada bagian daunnya. Kandungan kimia yang dimiliki daun Senduduk antara lain saponin, flavonoid dan tanin terhidrolisis yang biasa disebut dengan Nobotanin B. Bunga Senduduk mengandung kaempferol, antosianin, tanin, asam lemak dan sterol.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa daun senduduk (*Melastoma malabathricum* L) mengandung senyawa tanin, flavonoid, steroid, saponin, dan glikosida yang berfungsi membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Zat aktif yang dikandung daun senduduk yang berperan sebagai penyembuh luka yaitu :

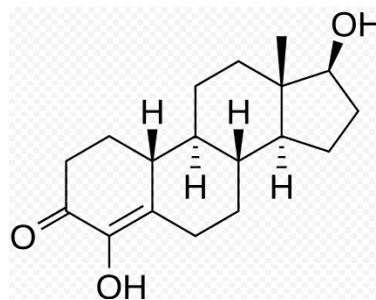
a. Flavonoid



Gambar 2. Struktur kimia Flavonoid (Arini,S dkk, 2003)

Flavonoid berfungsi sebagai anti inflamasi, anti alergi, antioksidan. Hal ini disebabkan karena kemampuan flavonoid mencegah oksidasi dan menghambat zat yang bersifat racun yang bisa timbul pada luka.

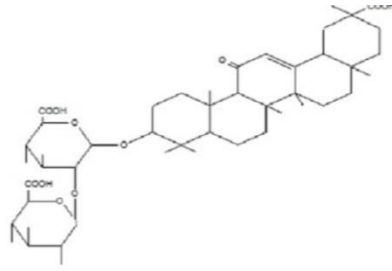
b. Steroid



Gambar 3. Struktur Kimia Steroid (Patel *ed al*, 2014)

Steroid berfungsi sebagai anti radang yang mampu mencegah kekakuan dan nyeri.

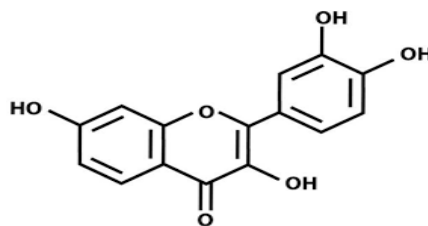
c. Saponin



Gambar 4. Struktur Kimia Saponin (Patel *ed al*, 2014)

Saponin memiliki kemampuan sebagai pembersih dan antiseptik yang berfungsi membunuh atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme. Sehingga mencegah terjadinya infeksi berat pada luka.

d. Tanin



Gambar 5. Struktur Kimia Tanin (Harborne, 1987).

Tanin berfungsi sebagai astringent yang menyebabkan penciutan pori-pori kulit, memperkuat kulit, menghentikan eksudat dan pendarahan sehingga mampu menutupi luka dan mencegah pendarahan yang biasa timbul pada luka.

Senyawa tanin memiliki efek farmakologis seperti antibakteri, antiinflamasi, antimikroba, dan astringen yang dapat menyembuhkan luka. Efek antibakteri ini diduga karena kemampuan tanin untuk berikatan dengan dinding sel bakteri, sehingga akan menginaktifkan kemampuan menempel bakteri tersebut pada inang, mendenaturasi protein, mengganggu aktivitas enzimatis, serta menurunkan

tegangan permukaan. Penurunan tegangan permukaan tersebut akan meningkatkan permeabilitas dan penurunan ion kalsium yang akan menghambat pertumbuhan sel dan mengakibatkan sel bakteri mati. Hal tersebut akan membantu dalam proses penyembuhan luka pada kulit terutama yang disebabkan oleh infeksi bakteri.

Efek farmakologis pada senyawa flavonoid yang berperan dalam proses penyembuhan luka seperti antibakteri, antimikroba, antiinflamasi, antioksidan, antibiotik, antikarsinogenik, dan melindungi pembuluh darah. Mekanisme kerja antimikroba pada flavonoid dengan cara menghancurkan protein sel bakteri yang mengkontaminasi luka sehingga dapat meminimalisir atau menghindari terjadinya infeksi. Flavonoid juga dapat berperan langsung sebagai antibiotik dengan cara mengganggu metabolisme mikroorganisme pada aktivitas transpeptidase peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel mikroorganisme akan terganggu dan sel mengalami lisis.

Mekanisme kerja flavonoid dalam melindungi pembuluh darah akan terjadi ketika ada kerusakan pada pembuluh darah kapiler akibat jejas yang menyebabkan peningkatan permeabilitas kapiler, sehingga darah (terutama plasma darah) akan keluar dari kapiler ke jaringan, dan akan diikuti terjadinya respon inflamasi. Aktivitas flavonoid terhadap pembuluh darah tersebut berkaitan erat dengan kemampuannya dalam menghambat adhesi platelet, agregasi platelet, leukosit, serta enzim pembekuan darah. Menurut Sabir, mekanisme flavonoid dalam melindungi pembuluh darah dengan cara meningkatkan proses biosintesis asam mukopolisakarida substansi dasar dari jaringan ikat, yang akan menyebabkan peningkatan efek barrier dari endotelium melalui stabilisasi fosfolipid membran

dan adanya perbaikan pada pembungkus perikapiler mukosapolisakarida. Peningkatan proses biosintesis asam mukopolisakarida substansi dasar jaringan ikat ini akan menyebabkan peningkatan pembentukan kapiler baru dan serabut kolagen sehingga luka akan cepat menutup dan sembuh.

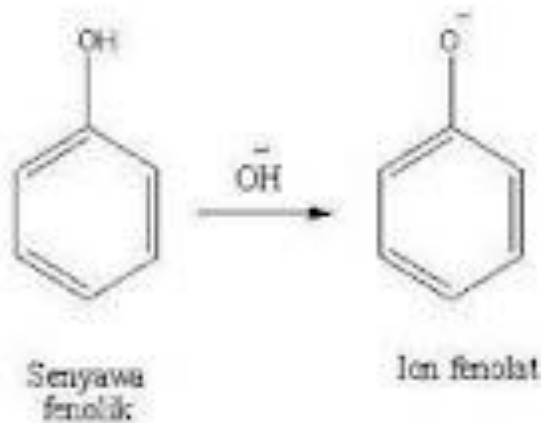
Efek farmakologis dari senyawa saponin seperti antibakteri, antiseptik, antijamur, dan juga merangsang pembentukan kolagen. Mekanisme kerja senyawa saponin sebagai antibakteri dengan cara merusak membran sitoplasma pada sel bakteri penyebab terjadinya infeksi, sehingga bakteri tersebut akan mati. Menurut FatimatuZZahroh, senyawa saponin diduga mampu merangsang pembentukan kolagen (struktur protein) yang berperan dalam proses penyembuhan luka, menstimulasi pembentukan pembuluh darah, serta mempunyai kemampuan meningkatkan proses angiogenesis dengan memicu pelepasan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) yang berperan penting dalam pembentukan kembali pembuluh darah.

2.2 Hidrolisis

Hidrolisis adalah suatu proses antara reaktan dengan air agar suatu senyawa pecah atau terurai. Reaksi ini merupakan reaksi orde satu, karena air yang digunakan berlebih. Sehingga perubahan reaktan dapat diabaikan. Asam yang biasa digunakan adalah asam asetat, asam fosfat, asam klorida, dan asam sulfat. Laju proses hidrolisa akan bertambah oleh konsentrasi asam yang tinggi. Selain dapat menambah laju proses hidrolisis, konsentrasi asam yang tinggi juga akan mengakibatkan terikatnya ion-ion pengontrol seperti SiO_2 , fosfat, dan garam-garam seperti Ca, Mg, Na, dan K dalam pati (Retno 2009).

2.3 Fenolik

2.3.1 Defenisi fenolik



Gambar 6. Struktur kimia fenolik (Pratt dan Hudson, 1990).

Senyawa fenolat adalah senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang menempel pada cincin aromatik. Dengan kata lain, senyawa fenolat adalah senyawa yang sekurang-kurangnya memiliki satu gugus fenol (Vermerris & Nicholson, 2006). Kandungan fenol total dari sampel yang mengandung antioksidan dapat diketahui dengan mengukur kapasitas reduksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteu menggunakan spektrofotometer. Metode ini mengukur kemampuan sampel pada kondisi basa untuk mereduksi pereaksi Folin-Ciocalteu yang berwarna kuning sehingga menyebabkan perubahan warna menjadi biru gelap. Pereaksi Folin-Ciocalteu merupakan kompleks dari fosfomolybdat-fosfotungstat. Molybdenum pada kompleks ini, yang memiliki warna kuning akan tereduksi oleh anion fenolat menjadi berwarna biru (Yu, 2008).

2.3.2 Klasifikasi Fenolik

Banyaknya variasi gugus yang mungkin tersubstitusi pada kerangka utama fenol menyebabkan kelompok fenolik memiliki banyak sekali anggota. Terdapat lebih dari 8.000 jenis senyawa yang termasuk dalam golongan senyawa fenolik. Oleh karena senyawa kimia yang tergolong sebagai senyawa fenolik sangat banyak macamnya. Berbagai cara klasifikasi dilakukan oleh banyak ilmuwan.

a. Senyawa fenolik sederhana

Secara umum senyawa fenolik sederhana memiliki sifat bakterisidal, antiseptik, dan antihelmintik. Senyawa dari kelompok ini merupakan hasil substitusi gugus fenol. Substitusi tersebut bisa berupa dua gugus atau satu gugus dalam posisi orto, meta, para. Contoh senyawa fenolik sederhana yang tersubstitusi oleh dua dan satu gugus hidroksil berturut-turut adalah floroglukinol dan resorsinol. Contoh senyawa fenol sederhana lainnya adalah p-kresol, 3-etilfenol, 3-4-dimetilfenol, dan hidrokarbon. Asam fenolat dan senyawa yang berhubungan lainnya

Senyawa fenolik dari golongan asam fenolat adalah fenol yang tersubstitusi oleh gugus karboksil. Contoh asam fenolat adalah asam galat. Asam galat merupakan trifenol yang biasa terdapat di daun teh dalam bentuk teresterifikasi bersama dengan katein. Selain gugus karboksil, gugus lainnya seperti aldehyd juga dapat tersubstitusi di gugus fenol, contoh senyawa dari jenis ini adalah vanillin.

2.3.3 Sifat-sifat fisika dan kimia dari fenolik

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang agak asam dan dapat larut dalam basa karena berupa senyawa polihidroksil (gugus hidroksil). Fenolik bersifat polar sehingga dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, aseton, air,

butanol, dimetilsulfoksida dan dimetil formamida. Salah satu sub kelas dari fenolik yaitu golongan flavonoid. Di alam cenderung terikat dalam bentuk glikosida. Sehingga menyebabkan kepolaran flavonoid meningkat dan menjadi mudah larut dalam air. Zat golongan fenolik dan flavonoid umumnya merupakan zat warna merah, ungu, biru dan kuning yang ditemukan secara alami pada tumbuh-tumbuhan.

2.4 Antioksidan

2.4.1 Definisi antioksidan

Antioksidan Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor). Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang dapat menangkal atau meredam dampak negatif oksidan. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga aktivitas senyawa oksidan tersebut dapat di hambat (Sayuti., et al., 2015). Antioksidan dibutuhkan tubuh untuk melindungi tubuh dari serangan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar atau jumlah tertentu mampu menghambat atau memperlambat kerusakan akibat proses oksidasi (Sayuti., et al., 2015).

2.4.2 Klasifikasi Antioksidan

a. Antioksidan Sintetis

Antioksidan sintetis yang biasa digunakan yaitu BHA dan BHT. BHA memiliki kemampuan antioksidan yang baik pada lemak hewan dalam sistem makanan panggang, namun relatif tidak efektif pada minyak tanaman. BHA bersifat larut lemak dan tidak larut air, berbentuk padat putih dan dijual dalam bentuk tablet atau serpih, bersifat volatil sehingga berguna untuk penambahan ke

materi pengemas (Sayuti., *et al.*, 2015). Antioksidan sintetis BHT memiliki sifat serupa BHA, akan memberi efek sinergis bila dimanfaatkan bersama BHA, berbentuk kristal padat putih dan digunakan secara luas karena relatif murah. Salah satu antioksidan sintetis yang sering digunakan adalah butil hidroksi toluena (BHT) dikarenakan senyawa ini tidak beracun dan dapat menunjukkan aktifitas sebagai antioksidan dengan cara men-deaktifasi senyawa radikal (Sayuti., *et al.*, 2015).

b. Antioksidan Alami

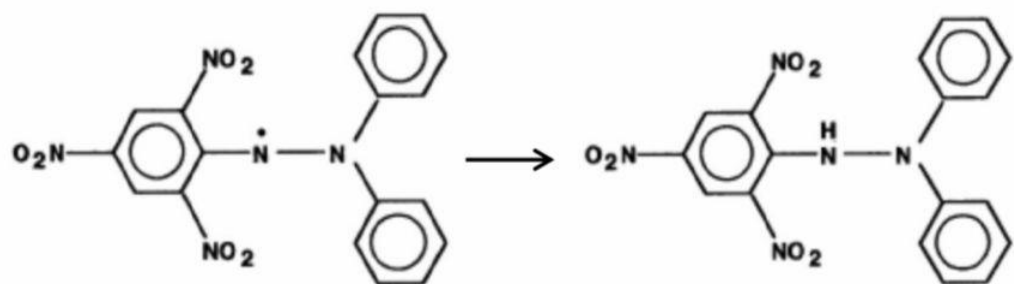
Antioksidan alami merupakan antioksidan yang diperoleh dari bahan alam. Sebagian besar berasal dari tumbuhan tingkat tinggi yang telah diuji aktivitasnya sebagai antioksidan merupakan golongan fenol dan turunannya, sedangkan yang lainnya merupakan senyawa golongan nitrogen dan beberapa bentuk senyawa lain. Antioksidan tersebut dapat dibedakan pula berdasarkan nilai gizinya, yaitu 14 antioksidan gizi seperti tokoferol, vitamin C, karotenoid, dan antioksidan non gizi seperti senyawa fenolik dan asam organik (Jovanovic, 2001). Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan fenolik/favonoid, senyawa α , β , γ , δ tokoferol, lesitin, vitamin E, vitamin C dan β -karoten (Jovanovic, 2001).

2.5 Radikal DPPH

Metode absorbansi radikal DPPH merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, 2005). Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 517 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH, dengan konsentrasi DPPH 50 μ M. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel

mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam etanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Andayani dkk, 2008).

Prinsip metode pengujian DPPH didasarkan pada reduksi dari larutan radikal bebas DPPH oleh senyawa antioksidan yang terkandung dalam suatu ekstrak tanaman tertentu. Ketika larutan DPPH berinteraksi dengan suatu larutan pendonor elektron yang dalam hal ini adalah antioksidan, elektron tunggal pada radikal bebas larutan DPPH menjadi berpasangan. Reaksi larutan yang mengandung senyawa antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH kemudian akan membentuk DPPH tereduksi (Gambar 3). Reaksi tersebut menyebabkan warna larutan akan berubah dari ungu tua menjadi kuning pucat, seiring dengan banyaknya DPPH yang tereduksi. Hasil dekolorisasi larutan DPPH oleh senyawa antioksidan tersebut setara dengan jumlah elektron yang tertangkap atau jumlah hidrogen yang diserap (Moon & Shibamoto, 2009; Mishra & Chaudhury, 2012; Molyneux, 2004; Kedare & Singh, 2011).



Gambar 7. Reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan (Molyneux, 2004).

Aktivitas antioksidan selanjutnya dianalisis menggunakan alat spektrofotometri UV-Vis berdasarkan perubahan absorbansi DPPH pada panjang

gelombang tertentu. Salah satu parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah nilai Efficient Concentration 50% (EC50) atau yang lebih dikenal dengan Inhibitory Concentration 50% (IC50). Nilai Inhibitory Concentration 50% (IC50) atau konsentrasi inhibisi adalah konsentrasi ekstrak (mikrogram/mililiter) yang mampu menangkap 50% radikal bebas DPPH atau yang mampu menghambat 50% oksidasi (Molyneux, 2004). Interpretasi harus dilakukan dengan cermat sebab hasil dapat bias oleh adanya faktor cahaya, oksigen, pH, dan jenis pelarut pada senyawa antioksidannya (Kedare & Singh, 2011). Hasil senyawa uji DPPH biasanya dibandingkan dengan nilai IC50 dari vitamin C, vitamin E, atau kuersetin yang merupakan senyawa antioksidan alami (Sami *et al.*, 2016).

2.6 Spektrofotometer UV-Vis

Spektrofotometer adalah alat yang terdiri dari spectrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spektrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditransmisikan atau yang diabsorpsi (Dachriyanus, 2013). Spektrofotometri merupakan salah satu metode analisis yang berdasarkan pada hasil interaksi tersebut akan menghasilkan peristiwa berupa hamburan, serapan, dan emisi (Mulja, 1995). Spektrum UV-Vis merupakan hasil interaksi radiasi UV-Vis terhadap molekul yang mengakibatkan molekul mengalami transisi elektronik, sehingga disebut spectrum elektronik. Hal ini didapat karna adanya gugus berikatan rangkap atau terkonjugasi yang mengabsorpsi radiasi elektromagnetik di daerah UV-Vis (Dachriyanus, 2013).

Spektrofotometri UV-Vis adalah metode yang digunakan untuk menguji sejumlah cahaya yang diabsorpsi pada setiap panjang gelombang di daerah UV-Vis dan tampak dalam instrument ini suatu sinar cahaya terpisah sebagian cahaya diarahkan melalui sel transparan yang mengandung suatu larutan senyawa tetapi mengandung pelarut. Ketika radiasi elektromagnetik dalam daerah UV-Vis melewati suatu senyawa yang mengandung ikatan-ikatan rangkap sebagian dari radiasi biasanya diabsorpsi oleh senyawa, hanya beberapa radiasi yang diabsorpsi tergantung pada panjang gelombang dari radiasi dalam struktur senyawa (Dachriyanus, 2013).

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan kurang lebih 3 bulan dari bulan september sampai desember 2022 di Laboratorium penelitian Universitas Perintis Indonesia (UPERTIS).

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis, rotari evaporator, Beaker glas, pipet ukur, tabung reaksi, labu ukur, pipet tetes, vial, tabung reaksi, corong, plat tetes, blender, timbangan analitik, aluminium foil, bola hisap, kertas saring, dan spatel.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah daun *Melastoma malabathricum* L, DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil), pelarut ethanol, pelarut metanol, etil asetat, n-heksan, HCl 2N, HCl 4N, HCl 6N, asam galat, natrium karbonat, Folin-Ciocalteu, dan aquadest.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel yang digunakan adalah daun tanaman *Melastoma malabathricum* L yang diperoleh dari daerah Lubuk Minturun, Padang, Sumatra Barat.

3.3.2 Identifikasi Sampel

Identifikasi tanaman dilakukan untuk memastikan jenis tanaman yang digunakan untuk penelitian. Sampel *Melastoma malabathricum* L diidentifikasi di

Herbarium Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Andalas, Padang.

3.3.3 Pembuatan larutan HCl

1. HCl 2N

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1 \cdot 12,06N = 100\text{ml} \cdot 2N$$

$$V_1 = \frac{200}{12,06} = 16,58 \text{ ml}$$

Larutan HCl 12N dipipet 16,58 ml kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambah aquadest hingga tanda batas.

. HCl 4N

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1 \cdot 12,06N = 100 \text{ mL} \cdot 4N$$

$$N_1 = \frac{400}{12,06} = 33,16 \text{ mL}$$

Larutan HCl 12N dipipet 33,16 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambah aquadest hingga tanda batas.

1. HCl 6N

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1 \cdot 12,06N = 100 \text{ mL} \cdot 6N$$

$$N_1 = \frac{600}{12,06} = 50,24 \text{ mL}$$

Larutan HCl 12N dipipet 50,24 mL kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 100 ml dan ditambah aquadest hingga tanda batas.

1.3.4 Ekstraksi Sampel *Melastoma malabathricum* L

Daun *Melastoma malabathricum* L dipisahkan dari batangnya dan diambil sebanyak 5 kg, lalu tanaman dicuci dengan air mengalir dan kemudian dikering anginkan selama ± 3 hari dan dihaluskan menggunakan blender, Kemudian serbuk ditimbang dan didapatkan hasil 1.800 gram. Kemudian serbuk daun senduduk di sokletasi dengan n-heksan. Sokletasi dilakukan sampai randemen terakhir tidak berwarna lagi. Prosedur ini digunakan untuk menghilangkan zat-zat lipofilnya. Ampas sokletasi dimaserasi dalam wadah botol coklat menggunakan pelarut etanol 96%. Proses maserasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan hasil maserasi disaring hingga diperoleh filtrat. Semua filtrat hasil maserasi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C , Putaran 95 rpm hingga diperoleh ekstrak kental etanol, ekstrak kental lalu ditimbang untuk menghitung randemen.

Untuk pengujian selanjutnya, ekstrak etanol dibagi menjadi beberapa bagian sesuai prosedur hidrolisis berikut ini :

1. Ekstrak A (tanpa hidrolisis)

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian diencerkan dengan metanol 25 ml dan aquadest 25 ml.

2. Ekstrak B

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian dilarutkan dalam 25 ml metanol dan 25 ml HCl 2N, kemudian dipanaskan sambil diaduk pada suhu 60°C selama 1 jam.

3. Ekstrak C

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian dilarutkan dalam 25 ml metanol dan 25 ml HCl 4N, kemudian dipanaskan sambil diaduk pada suhu 60°C selama 1 jam.

4. Ekstrak D

Ekstrak etanol ditimbang sebanyak 3 gram, kemudian dilarutkan dalam 25 ml metanol dan 25 ml HCl 6N, kemudian dipanaskan sambil diaduk pada suhu 60°C selama 1 jam.

Setelah proses hidrolisis, masing-masing ekstraksi A, B, C, dan D difraksinasi dengan etil asetat 50 ml. Proses fraksinasi diulang hingga lapisan etil asetat tidak berwarna lagi. Seluruh fraksi etil asetat dari masing-masing ekstrak secara terpisah dipekatkan dengan rotary evaporator.

Fraksi kental etil asetat dari masing-masing ekstrak diberi nama sebagai berikut:

1. Fraksi A : fraksi tanpa hidrolisis (FA)
2. Fraksi B : fraksi hidrolisis B (FB)
3. Fraksi C : fraksi hidrolisis C (FC)
4. Fraksi D : fraksi hidrolisis D (FD)

Masing-masing fraksi diatas dilakukan analisis lanjutan.

3.4 Karakterisasi Fraksi

3.4.1 Pemeriksaan Organoleptis

Pemeriksaan organoleptis dilakukan dengan cara mengamati bentuk, warna, dan bau dari fraksi.

3.4.2 Penentuan % Rendemen

Persentase rendemen dari sampel dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut : (Departemen Kesehatan RI, 2000) :

$$\text{Randemen \%} = \frac{\text{Bobot fraksi (g)}}{\text{Bobot serbuk kering (g)}} \times 100\%$$

3.4.3 Identifikasi Senyawa Fenolik

Fraksi A, B, C dan fraksi D diidentifikasi kandungan fenolatnya dengan menggunakan reagen FeCl_3 10%. Kandungan fenolik pada sampel ditunjukkan dengan hasil reaksi berupa terbentuknya warna ungu, biru, merah, dan hijau kehitaman pada plat tetes (Departemen Kesehatan RI, 1979).

3.5 Pembuatan Larutan

3.5.1 Pembuatan Larutan Natrium Karbonat (Sam Sulastri dkk, 2016).

Natrium karbonat ditimbang sebanyak 10 g kemudian larutkan dengan aquadest hingga 100 ml.

3.5.2 Pembuatan Larutan Induk Asam Galat $500 \mu\text{g/mL}$ (Hapsari et al., 2018).

Sebanyak 12,5 mg asam galat dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan $500 \mu\text{g/mL}$.

3.6 Penentuan Fenolat Total

3.6.1 Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum asam galat-Folin-Ciocalteu (Pourmonad, dkk 2006).

Larutan induk asam galat 500 ppm dipipet sebanyak 2 ml ke dalam labu ukur 25 ml. lalu encerkan metanol : aquadest (1:1) sampai tanda batas sehingga didapatkan konsentrasi 40 ppm. Lalu sebanyak 0,5 ml larutan asam galat 40 ppm dipipet kemudian dicampurkan pereaksi Folin-Ceucalteu sebanyak 5 ml, dan ditambah 4 ml natrium karbonat. Kocok homogen, diamkan selama 15 menit kemudian diukur panjang gelombang serapan maksimum dengan spektrofotometer Uv-vis. (750,00 nm)

3.6.2 Pembuatan Deret Konsentrasi Standar dan Kurva Kalibrasi.

Dari larutan induk asam galat 500 ppm dipipet (0,6;0,8;1;1,2; dan 1,4 ml) kemudian diencerkan dengan metanol aquadest (1:1) dalam labu ukur 10 mlsamapi tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi (30;40;50;60; dan 70 ppm) kemudian masing-masing konsentrasi dipipet 0,5 ml lalu dicampurkan dengan 5 ml Folin-Ceucalteu dan ditambah 4 ml natrium karbonat. Diamkan selama 15 menit kemudian diukur panjang gelombang serapan maksimum dengan spektrofotometer Uv-Vis.

3.6.3 Pembuatan Larutan Uji.

Ditimbang sebanyak 10 mg masing-masing sampel FA, FB,FC,FD dilarutkan dengan 0,5 metanol p.a kemudian tambahkan dengan aquadest sampai folum pada labu ukur 10 ml sehingga didapat konsentrasi 1000 ppm.

3.6.4 Penetapan Kadar Fenolik Total Larutan Uji

Dipipet 0,5 larutan konsentrasi 1000 ppm dari sampel FA, FB, FC, FD.. lalu tambahkan 2 ml Folin-Ceucalteu dan tambahkan 4 ml natrium karbonat dikocok sampai homogen, biarkan pada suhu kamar selama 15 menit, hingga terbentuk warna biru, lalu diukur dengan Spektrofotometer Uv-Vis. Hitung kadar fenolat total dengan menggunakan rumus persamaan regresi linear menggunakan hukum Lambert-Beer yaitu $y = a + bx$, dimana y adalah absorbansi dan x adalah konsentrasi.

Dimasukkan ke dalam rumus yaitu :

$$KFT = \frac{c \times V}{\text{bobot sampel uji}} \times 100 \% \text{ b/b}$$

Keterangan :

KFT : kadar fenolik total

c : konsentrasi (ppm)

V : volume (mL)

Nilai fenolik total dinyatakan dalam % b/b

3.7 Penentuan Aktivitas Antioksidan

3.7.1 Pembuatan Larutan DPPH 35 Ppm

Timbang 10 mg DPPH masukkan kedalam labu ukur 100 mL, lalu tambah metanol p.a sampai tanda batas kemudian dipipet sebanyak 17,5 mL larutan DPPH masukkan kedalam labu ukur 50 mL lalu tambahkan metanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 35 ppm.

3.7.2 Penentuan Gelombang Serapan Maksimum DPPH (Musquera,2007)

Dipipet sebanyak 4 ml larutan DPPH 35 ppm yang baru dibuat, masukkan kedalam vial lalu tambahkan 2 ml metanol p.a dan diamkan selama 30 menit ditempat gelap dan diukur serapannya dengan Spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 400 – 800 nm (Molyneux, 2004).

3.7.3 Penentuan Aktivitas Antioksidan Pembanding Asam Galat (Pourmorad Dkk, 2006).

Dipipet 10 ml larutan induk asam galat 500 ppm kemudian dilarutkan dalam campuran metanol p.a dan aquadest (1:1) dalam labu 100 mL sampai tanda batas, sehingga diperoleh larutan standar asam galat dengan konsentrasi 50 ppm. Dari larutan ini masing-masing dipipet (0,2;0,4;0,6;0,8;dan 1 ml) lalu dimasukkan dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1;2;3;4;dan 5 ppm. Dipipet masing-masing larutan sebanyak 2 ml lalu dimasukkan kedalam vial kemudian tambahkan 4 ml DPPH 35 ppm, campuran dihomogenkan. Biarkan selama 30 menit ditempat gelap. Ukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis dan tentukan aktivitas antioksidan dengan menghitung % inhibisi.

3.7.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Fraksi A, B, C Dan Fraksi D

Diambil masing-masing sebanyak 25 mg fraksi A, B, C dan fraksi D, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL sampai tanda batas hingga diperoleh larutan standar dengan konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan standar dipipet (0,2;0,4;0,6;0,8 dan 1 ml) kemudian tambahkan masing-masing metanol dan aquadest (1:1) dalam labu ukur 10 ml sampai tanda batas sehingga diperoleh masing-masing sampel dengan konsentrasi 20,40,60,80, 100 ppm. Pipet masing-masing konsentasi sebanyak 2 ml larutan sampel dengan menggunakan

pipet mikro dan dimasukkan kedalam vial, kemudian tambahkan 4 ml DPPH 50 ppm. Campuran dihomogenkan, biarkan selama 30 menit ditempat gelap. Ukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis dan tentukan aktivitas antioksidan dengan menghitung % inhibisi.

3.8 Analisis Data

3.8.1 Perhitungan % Inhibisi

Besarnya persentase penghambatan terhadap radikal DPPH dihitung sebagai presentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan rumus (Zuhra dkk, 2008):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorban Kontrol : Serapan larutan radikal DPPH 35 µg/ml.

Absorban Sampel : Serapan larutan sampel ditambah larutan DPPH 35 µg/ml.

3.8.2 Perhitungan IC₅₀

Penentuan IC₅₀ merupakan besarnya konsentrasi larutan uji untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Untuk mendapatkan nilai IC₅₀ aktivitas antioksidan. Maka terlebih dahulu dibuat kurva standar aktivitas yang dibentuk dari data nilai persentase inhibisi dari minimal 5 deret konsentrasi ekstrak sebagai sumbu y dan konsentrasi ekstrak antioksidan sebagai sumbu x.

Dari hasil kurva standar diperoleh persamaan regresi linear. Nilai IC₅₀ dihitung dengan cara memasukkan nilai 50% kedalam persamaan kurva standar sebagai sumbu y kemudian dihitung nilai x sebagai konsentrasi IC₅₀

$$y = a + bX$$

Sehingga pada akhirnya diperoleh nilai konsentrasi hambat 50% ($x = IC_{50}$). Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya (Molyneux, 2004). konsentrasi IC_{50} Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidannya.

Tabel 1. Tingkat kekuatan antioksidan dengan metode DPPH (fidrianny *et al.*, 2004).

Intensitas	Sangat kuat	Kuat	Sedang	Lemah
IC_{50}	< 50 ppm	50-100 ppm	101-250 ppm	>500 ppm