IDENTIFIKASI KOMPONEN MINYAK ATSIRI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK ATSIRI DAN KOMPONEN NON ATSIRI RIMPANG BANGLE HANTU (*Zingiber ottensii* Val.)

LAPORAN TUGAS AKHIR

FITRIA WAHYU PRATIWI

13151011

SEKOLAH TINGGI FARMASI BANDUNG

PROGRAM PENDIDIKAN STRATA I FARMASI

BANDUNG

2017

LEMBAR PENGESAHAN

IDENTIFIKASI KOMPONEN MINYAK ATSIRI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK ATSIRI DAN KOMPONEN NON ATSIRI RIMPANG BANGLE HANTU (*Zingiber ottensii* Val.)

TUGAS AKHIR II

Diajukan untuk memenuhi persyaratan kelulusan
Program Strata Satu Farmasi

FITRIA WAHYU PRATIWI

13151011

Bandung, Agustus 2017

Menyetujui,

Pembimbing I	Pembimbing II
Lia Marliani, M.Si., Apt.	Aris Suhardiman, M.Si., Apt.

ABSTRAK

IDENTIFIKASI KOMPONEN MINYAK ATSIRI DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MINYAK ATSIRI DAN KOMPONEN NON ATSIRI RIMPANG BANGLE HANTU (*Zingiber ottensii* Val.)

Oleh :
Fitria Wahyu Pratiwi
13151011

Rimpang bangle hantu, *Zingiber ottensii* Val. merupakan salah satu obat tradisional yang digunakan oleh wanita setelah melahirkan, mengobati gatal-gatal, sakit pinggang, demam, encok dan batuk, antioksidan, antibakteri. Senyawa kimia yang terkandung adalah minyak atsiri (terpenoid dan diarilheptanoid). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui komponen minyak atsiri rimpang yang berasal dari Indonesia dan aktivitas antioksidan dari minyak atsiri dan residu destilasi rimpang. Isolasi minyak atsiri dengan metode destilasi uap air dan dianalisis komponen senyawanya dengan GC-MS (*Gas Chromatography – Massa Spectrometer*). Residu destilasi dikumpulkan, dikeringan kemudian dimaserasi dan dipekatkan. Pengujian aktivitas antioksidan minyak atsiri dan ekstrak non atsiri dilakukan dengan metode peredapaman radikal bebas DPPH (2,2difenil-1-pikrilhidrazil). Hasil menunjukkan minyak atsiri rimpang mengandung 64 senyawa komponen minyak atsiri dengan lima senyawa terbesar berturut turut adalah 1-4-terpineol, Zerumbon, Sabinen, 1,8-cineol, Gamma-terpinen. Minyak atsiri dan ekstrak non atsiri rimpang tersebut tidak aktif sebagai antioksidan. Nilai IC_{50} yang diperoleh sampel lebih dari 500 µg/mL.

Kata kunci : Bangle hantu, *Zingiber ottensii* Val, minyak atsiri, destilasi, GCMS, antioksidan

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND NON ATSIRI COMPONENT OF Zingiber ottensii Val.

By:
Fitria Wahyu Pratiwi
13151011

Zingiber ottensii Val. rhizome is one of traditional medicine that used by women after childbirth, treat itching, lumbago, fever, gout, cough, and has been test for antioxidants, antibacterials. The one of chemical compound of rhizome is the essential oil (terpenoids and diarylheptanoid). The aims of this study were to determine the essential oil component of rhizome which originated from Indonesia and antioxidants activity of essential oil and distillation residue of rhizome. The isolation of essential oil was done by water vapor distillation method and analyzed its component compounds with GC-MS (Gas Chromatography - Mass Spectrometer). The distillation residue is collected, dried and then macerated and concentrated. The antioxidant activity of essential oils and residual distillation extracts was done by free radical DPPH (2,2diphenyl-1-picrylhydrazyl) reduction method. The result showed that the essential oil of rhizome contains 64 components with five highest compounds respectively are 1-4-terpineol, Zerumbone, Sabinene, 1,8-cineole, Gamma.-terpinene. The essential oil and non atsiri extract of rhizome are not active as an antioxidant. The value of IC_{50} obtained by sample is more than 500 µg/mL.

Keywords: *Zingiber ottensii* Val, essential oil, distillation, GCMS, antioxidant

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi yang tidak dipublikasikan terdaftar dan tersedia di Perpustakaan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung, dan terbuka untuk umum.

Referensi kepustakaan diperkenankan dicatat, tetapi pengutipan atau peringkasan hanya dapat dilakukan seizin pengarang dan harus disertai dengan kebiasaan ilmiah untuk menyebutkan sumbernya.

Memperbanyak atau menerbitkan sebagian atau seluruh skripsi haruslah seizin Ketua Program Studi di lingkungan Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.

Kupersembahkan untuk :

Ayah dan Ibuku yang selalu memberikan doa dan dukungan

Kakak dan adikku yang selalu memberikan semangat

Teman – teman yang selalu berjuang bersama

Ibu Lia Marliani yang telah memberikan bimbingan

Bp Aris Suhardiman yang telah memberikan bimbingan

Dan Almamaterku tercinta

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini yang berjudul "Identifikasi Komponen Minyak Atsiri Dan Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri Dan Komponen Non Atsiri Rimpang Bangle Hantu (*Zingiber ottensii* Val.)" tepat pada waktunya.

Tugas akhir ini disusun sebagai salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) pada Program Strata Satu Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Bandung. Dalam penyusunan Tugas Akhir ini, penulis banyak mendapatkan bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada :

1. Entris Sutrisno, S.Farm., MH.Kes., Apt. Selaku Ketua Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
2. Ari Yuniarto, M.Si., Apt. Selaku Ketua Program S1 Farmasi Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
3. Lia Marliani, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan Aris Suhardiman, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing serta yang telah memberikan dorongan dan bimbingan dalam penyusunan Tugas Akhir ini.
4. Seluruh dosen serta staf Sekolah Tinggi Farmasi Bandung.
5. Kedua orang tuaku yang selalu memberikan dukungan dan doa dalam penyusunan Tugas Akhir ini.
6. Semua teman – teman yang telah berjuang bersama dan juga almamaterku tercinta.

7. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan atas tersusunnya Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari dalam penulisan Tugas Akhir ini mungkin ada kekurangan. Penulis berharap semoga hasil penelitian ini dapat memberikan informasi dan bermanfaat bagi pembaca.

Bandung, Agustus 2017

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

ABSTRAK iii

ABSTRACT iv

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI iv

HALAMAN PERUNTUKAN v

KATA PENGANTAR vi

DAFTAR ISI ix

DAFTAR LAMPIRAN xi

DAFTAR GAMBAR xii

DAFTAR TABEL xiii

BAB I PENDAHULUAN 1

I.1 Latar Belakang Masalah 1

I.2 Rumusan Masalah 2

I.3 Batasan Masalah 2

I.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian 3

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian 3

BAB II TINJAUAN PUSTAKA 4

II.1 Klasifikasi *Zingiber ottensii* Val 4

II.2 Minyak Atsiri 6

II.3 Antioksidan 13

II.4 *Microplate reader* (ELISA) 18

BAB III METODOLOGI PENELITIAN 19

BAB IV ALAT DAN BAHAN 20

IV.1 Alat 20

IV.2 Bahan 20

BAB V PROSEDUR 21

V.1 Penyiapan Bahan 21
V.2 Determinasi Bahan 21
V.3 Karakterisasi Rimpang Segar 21
V.4 Isolasi Minyak Atsiri dengan Metode Destilasi Uap Air 24
V.5 Analisis Minyak Atsiri dengan Metode GC-MS 24
V.6 Penyiapan dan Ekstraksi 25
V.7 Penapisan Fitokimia 25
V.8 Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis 27
V.9 Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri dan Ekstrak Residu dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH menggunakan *Microplate reader* 28
BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN 30
VI.1 Penyiapan Bahan 30
VI.2 Determinasi Bahan 30
VI.3 Karakterisasi Rimpang Segar 30
VI.4 Destilasi Minyak Atsiri 33
VI.5 Identifikasi Minyak Atsiri dengan Metode GC-MS 34
VI.6 Penyiapan dan Ekstraksi Simplisia 36
VI.7 Penapisan Fitokimia Ekstrak Non Atsiri 36
VI.8 Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis 37
VI.9 Aktivitas Antioksidan Minyak Atsiri dan Ekstrak Residu dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH menggunakan *Microplate reader* 40
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN 43
VII.1 Kesimpulan 43
VII.2 Saran 43
DAFTAR PUSTAKA 44
LAMPIRAN 48

DAFTAR LAMPIRAN

1. Bagan Alur Penelitian 49
2. Hasil Determinasi Tanaman *Zingiber ottensii* Val 50
3. Spektrum Hasil Spektrofotometri Massa 51
4. Absorban dan Kurva Sampel Minyak Atsiri dan Ekstrak Residu 54
5. Kurva Pembanding Vitamin C 55
6. Foto alat GC-MS dan *Microplate reader* 56

DAFTAR GAMBAR

Halaman

1. Tanaman *Zingiber ottensii* Val..... 5
2. Struktur DPPH 16
3. Rimpang Segar *Zingiber ottensii* Val. 31
4. Penampang melintang rimpang *Zingiber ottensii* Val..... 31
5. Proses Destilasi dengan Alat Destilasi Uap 33
6. Kromatogram Kromatografi Gas. 34
7. Spektrum Massa 1 – 4 terpineol..... 35
8. Struktur Kimia 1-4 terpineol 36
9. Kromatogram Lapis Tipis 38

DAFTAR TABEL

Halaman

1. Hasil Karakterisasi Rimpang Basah *Zingiber ottensii* Val 31
2. Hasil identifikasi Kandungan Senyawa Rimpang *Zingiber ottensii* Val 35
3. Hasil Penapisan Fitokimia Ekstrak non atsiri Rimpang *Zingiber ottensii* Val 37
4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan 42

BAB I PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang Masalah

Indonesia merupakan Negara yang kaya akan sumberdaya alamnya. Sumberdaya alam tersebut salah satunya adalah rempah-rempah. Rempah – rempah tersebut seringkali digunakan oleh masyarakat untuk pengobatan tradisional. Contoh dari tanaman Indonesia yang digunakan sebagai pengobatan salah satunya adalah tanaman keluarga *Zingiberaceae.*

Salah satu tanaman keluarga *Zingiberaceae* yang sering digunakan sehari-hari adalah *Zingiber ottensii* Val. (Bangle Hantu). Rimpang *Zingiber ottensii* Val. digunakan oleh wanita setelah melahirkan. Selain itu, *Zingiber ottensii* Val. juga digunakan untuk mengobati gatal-gatal, sakit pinggang, demam, encok dan batuk. (heyne, 1987), antioksidan (Kantanyos, 2012), antibakteri (Noverita, dkk, 2009), antikanker (Sinaga, dkk, 2013).

Bagian tanaman yang sering digunakan pada tanaman *Zingiber ottensii* Val. adalah bagian rimpangnya. Kandungan terbesar di dalam tanaman *Zingiber ottensii* Val. ini adalah minyak atsiri (terpenoid dan diarilheptanoid). Rimpang *Zingiber ottensii* Val memiliki kadar minyak atsiri 4,29 % (Marsusi, dkk, 2001).

Minyak atsiri *Zingiber ottensii* Val. merupakan minyak yang berwarna pucat kekuningan berbau khas champhorous. Minyak atsiri ini memiliki beberapa komponen yang dapat diidentifikasi dengan menggunakan *Gas Chromatograph-Mass Spectrometer* (GC-MS).

Terdapat 28 komponen minyak atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. yang terdiri dari campuran mono dan seskuiterpen dengan zerumbon menjadi komponen paling banyak dari total minyak. (Hidayat, 2015).

Penelitian terdahulu komponen minyak atsiri pada rimpang *Zingiber ottensii* Val. dari Thailand (Thubthimthed, 2005) dan Malaysia (Sri Nuresti, 2015) kandungan tertinggi adalah zerumbon. Penelitian komponen yang terdapat dalam rimpang *Zingiber ottensii* Val. masih sedikit terutama di Negara Indonesia, oleh karena itu akan diteliti komponen minyak atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. yang berasal dari Indonesia.

Peneliti juga akan meneliti manfaat dari minyak atsiri *Zingiber ottensii* Val. terutama aktivitasnya terhadap antioksidan. Penelitian tentang aktivitas antioksidan ini dilakukan pada minyak atsiri dan ekstrak non atsiri dari residu destilasi minyak atsiri *Zingiber ottensii* Val. tersebut.

I.2 Rumusan Masalah

1. Apa saja komponen minyak atsiri yang terkandung dalam rimpang *Zingiber ottensii* Val.?
2. Bagaimana aktivitas antioksidan dari minyak atsiri dan ekstrak non atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val.?

I.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah, pembatasan masalah dalam penelitian ini adalah identifikasi komponen minyak atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. dengan metode *Gas Chromatography – Massa*

Spectrometer (GCMS) dan pengujian aktivitas antioksidan minyak atsiri dan ekstrak non atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (2,2difenil-1-pikrilhidrazil).

I.4 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui komponen minyak atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. dan mengetahui aktivitas antioksidan minyak atsiri dan ekstrak non atsiri *Zingiber ottensii* Val. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar untuk penelitian lebih lanjut sehingga pemanfaatannya dapat digunakan oleh masyarakat.

I.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari – Juni 2017 di Laboratorium Farmakognosi-Fitokimia Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Bandung.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Klasifikasi *Zingiber ottensii* Val.

Kingdom	: Plantae
Division	: Spermatophyta
Class	: Monocotyledoneae
Ordo	: Zingiberales
Family	: *Zingiberaceae*
Genus	: Zingiber
Species	: *Zingiber ottensii* Val (Marsusi,dkk, 2001)
Nama daerah	: Bungle hantu (Pantai Timur Sumatra), Panglai hideung (sunda), bangle hantu (Heyne,1987).

Zingiber ottensii Val memiliki tinggi tumbuhan kurang lebih 2 m, membentuk rumpun yang padat seperti *Z. cassumunar*. Akar rimpang dalamnya berwarna ungu kotor, baunya tajam dan tidak enak. Tanaman bangle hantu ini biasanya dicampur dengan beberapa bahan untuk digunakan sebagai obat penenang yang dioleskan kalau ada orang sakit kejang. Di Pantai Timur Sumatra akar rimpang dapat digunakan untuk orang yang baru saja melahirkan (Heyne,1987).

Bagian yang digunakan dimanfaatkan adalah rimpang dan daunnya. Pemanfaatan untuk penyakit adalah bisa mengobati gatal-gatal, sakit pinggang, demam, encok dan batuk. Kandungan terbesar di dalam tanaman *Zingiber ottensii* Val ini adalah minyak atsiri (terpenoid dan diarilheptanoid).

Rimpang *Zingiber ottensii* Val menghasilkan 0,38% dari minyak yang berwarna pucat kekuningan berbau khas champhorous. Sebanyak 28 komponen diidentifikasi, mewakili 84,9% dari total minyak. Minyak yang terkandung yaitu campuran mono dan seskuiterpen dengan zerumbon menjadi komponen yang paling berlimpah dari total yang ada. Senyawa penting lainnya adalah terpinen-4-ol, p-cymene, sabinene, dan humulene (Hidayat,dkk, 2015). Rimpang *Zingiber ottensii* Val memiliki kadar minyak atsiri 4,29 % (Marsusi, dkk, 2001).

Zingiber ottensii Val memiliki aktifitas sebagai antioksidan dengan nilai IC_{50} 32,81 mg/mL (Kantanyos, dkk, 2012), antibakteri (Noverita, dkk, 2009), antikanker (Sinaga, dkk, 2013).

Gambar II.1. Tanaman *Zingiber ottensii* Val. (Ngoc-Sam, dkk, 2016)

Analisis minyak atsiri, rimpang *Zingiber ottensii* Val. dengan destilasi air, menggunakan GC-MS menemukan lebih dari 20 macam senyawa, di antaranya zerumbon (40,1%), terpinen-4-ol (11,2%), pcymene (6,9%), sabinen (6,5%) dan humulen (5,6%) (Thubthimthed, 2005).

II.2 Minyak Atsiri
II.2.1 Definisi

Minyak atsiri merupakan senyawa, yang pada umumnya berwujud cairan, yang diperoleh dari bagian tanaman, akar, kulit, batang, daun, buah, biji, maupun dari bunga dengan cara penyulingan. Meskipun kenyataan untuk memperoleh minyak atsiri dapat menggunakan cara lain seperti ekstraksi menggunakan pelarut organik atau dengan cara dipres (Sastromidjojo, 2004).

Ditinjau dari segi kimianya, minyak atsiri hanya mengandung dua golongan senyawa yaitu oleoptena dan stearoptena. Oleoptena adalah bagian hidrokarbon di dalam minyak atsiri dan berwujud cairan. Umumnya senyawa golongan oleoptena terdiri dari senyawa monoterpen, sedangkan stearoptena adalah senyawa karbon teroksigenasi yang umumnya berwujud padat. Stearoptena ini umumnya terdiri atas senyawa susunan oksigen dan terpen. Hampir semua minyak atsiri mengandung campuran senyawa kimia, dan biasanya campuran tersebut sangat kompleks. Beberapa tipe senyawa organik yang mungkin terkandung dalam minyak atsiri adalah hidrokarbon, alkohol, oksida, ester, aldehida, dan ester (Agoes, 2007).

Kandungan kimia utama *Zingiberaceae* adalah minyak atsiri. Minyak atsiri tersimpan dalam sel-sel parenkim yang termodifikasi dan terdapat di semua jaringan terutama rimpang. Minyak atsiri memiliki aroma khas, indeks bias tinggi, optis aktif, sudut putar spesifik, tidak larut dalam air, bening, serta berasa pedas, pahit dan hangat karena adanya resin (Burkill, 1935). Kandungan terbesar

Zingiber ottensii Val. adalah minyak atsiri (terpenoid dan diarilheptanoid) (hidayat,2015).

II.2.2 Aktivitas Farmakologi

Beberapa jenis bahan tumbuhan digunakan dalam pengobatan karena kandungan minyak atsirinya. Minyak atsiri biasanya digunakan sebagai obat setelah disuling atau diekstraksi dari sumbernya. Minyak atsiri larut dalam lemak sehingga kebanyakan menimbulkan iritasi pada kulit dan selaput lendir. Jika terkontaminasi terlalu lama kulit menjadi kemerahan serta meradang dan akan melepuh, contohnya limonena, p-simena, α-pinena, dan lain sebagainya. Tidak semua menyebabkan peradangan ataupun iritasi, turunan oksigen dari monoterpen (geraniol, sineol, linalool) tidak menimbulkan iritasi, malah memilki aktivitas sebagai antiradang. Minyak atsiri yang mengandung azulena sudah biasa digunakan untuk mengatasi radang selaput lendir.

Dalam bentuk murni, minyak atsiri dapat digunakan untuk beberapa terapi penyakit misalnya radang selaput sendi, sakit kepala, jantung berdebar, radang tenggorokan dan lain-lain (Agusta, 2000). Selain itu, minyak atsiri juga banyak digunakan sebagai pewangi dan juga aromaterapi (Agoes, 2007).

II.2.3 Pemisahan Minyak Atsiri

Pada umumnya minyak atsiri dapat diperoleh dengan cara penyulingan, karena prosesnya tidak rumit dan murah. Cara proses penyulingan ini dimana uap air dialirkan kedalam tumpukan bahan tumbuh-tumbuhan sehingga minyak atsiri tersuling bersama-sama

dengan uap air. Setelah pengembunan minyak atsiri akan membentuk lapisan yang terpisah dengan air selanjutnya minyak dihasilkan kemudian dikumpulkan. (Guenter, 1987). Ada beberapa metode yang digunakan untuk memisahkan minyak atsiri dari tumbuhan antara lain :

1. Penyulingan dengan air

Proses pengerjaan dengan metode ini sangat mudah, tetapi penyulingan langsung ini menyebabkan banyak rendemen minyak yang hilang (tidak tersuling) dan terjadi pula penurunan mutu minyak yang didapat. Selain itu penyulingan langsung ini juga menyebabkan terjadi pengasaman (oksidasi) serta persenyawaan zat ester yang dikandung dengan air sehingga timbul berbagai hasil sampingan yang tidak diinginkan (Lutony, 1994).

Metode destilasi dengan air (hidrodestilasi), bahan yang akan didestilasi dikontak langsung dengan air mendidih. Bahan tersebut mengapung di atas air atau terendam secara sempurna, tergantung dari berat jenis dan jumlah bahan yang didestilasi. Peristiwa pokok yang terjadi pada proses hidrodestilasi yaitu : difusi minyak atsiri dan air panas melalui membran tanaman, hidrolisa terhadap beberapa komponen minyak atsiri dan dekomposisi yang disebabkan oleh panas. Kecepatan penguapan minyak atsiri dalam proses hidrodestilasi bahan tidak dipengaruhi oleh sifat mudah menguapnya komponen-kompenen minyak atsiri, melainkan lebih banyak oleh derajat kelarutannya dalam air (Guenther, 1987).

Kelebihan penggunaan destilasi stahl antara lain: Minyak atsiri yang dihasilkan tidak berhubungan langsung dengan udara luar sehingga

tidak mudah menguap dan volume minyak atsiri yang dihasilkan dapat langsung diketahui jumlahnya karena alatnya dilengkapi dengan skala (Sastrohamidjojo, 2004).

2. Penyulingan dengan uap

Metode ini pada prinsipnya sama dengan destilasi dengan air dan uap kecuali air tidak diisikan dalam labu. Uap yang digunakan uap jenuh atau kelewat panas pada tekanan lebih dari pada 1 atmosfir. Uap dialihkan melalui pipa uap berlingkar yang berpori yang terletak dibawah bahan dan uap bergerak ke atas melalui bahan yang terletak di atas saringan (Guenther, 1987).

Tiga bagian utama alat pada metode ini adalah alat penyulingan yang berfungsi untuk tempat bahan tanaman yang akan diproses, pendingin berfungsi mengubah uap air yang mengandung uap minyak atsiri menjadi cairan dan penampung kondensat berfungsi untuk memisahkan minyak atsiri dari air yang terkondensasi secara sempurna. Dalam alat ini terdapat air yang berhubungan langsung dengan bahan tanaman dan menguapkan minyak atsiri yang dikandungnya. Kondensat mengalir dari pendingin ke penampung kondensat dan akan terlihat minyak atsiri yang dihasilkan akan terpisah dari air dengan sendirinya, karena berat jenis minyak atsiri lebih ringan dari pada air (Sastromidjojo, 2004).

3. Penyulingan dengan uap air

Dari segi komersial, penyulingan model ini sangat ekonomis sehingga banyak yang menggunakan model ini. Selain itu, rendemen yang dihasilkan cukup memadai dan bermutu (Lutony, 1994). Pada metode ini, bahan diletakkan di atas saringan berlubang. Ketel suling

diisi dengan air sampai permukaan air berada tidak jauh di bawah saringan. Air dapat dipanaskan dengan berbagai cara yaitu dengan uap jenuh yang basah dan bertekanan rendah. Ciri khas metode ini adalah uap selalu dalam keadaan basah, jenuh dan tidak terlalu panas (Guenther, 1987).

II.2.4 Identifikasi Komponen Minyak Atsiri

Komponen minyak atsiri sangat kompleks, biasanya tidak lebih dari 300 komponen. Presentase komponen yang paling tinggilah yang menentukan aroma minyak atsiri. Komponen minyak atsiri dapat diisolasi menggunakan teknik sederhana, namun hasilnya tidak memuaskan. Metode lain yang digunakan untuk menganalisa komponen minyak atsiri adalah dengan menggunakan *Gas Chromatography – Massa Spectrometer* (GC-MS).

Pada alat GC-MS ini, keduanya digabungkan dengan interface. Kromatografi gas di sini berfungsi sebagai alat pemisah berbagai komponen campuran dalam sampel, sedangkan spektrometer massa untuk mendeteksi masing-masing molekul komponen yang telah dipisahkan pada sistem kromatografi gas. Analisis dengan GC-MS mampu menganalisa cuplikan dalam jumlah kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur serta identitas senyawa organik. Unsur yang penting pada GC-MS adalah :

1. Gas Pembawa

Faktor yang menyebabkan suatu senyawa bergerak melalui kolom kromatografi gas ialah keatsiriannya, aliran gas yang melalui kolom yang diukur dalam satuan mL/menit, serta penurunan tekanan antara

pangkal dan ujung kolom. Gas pembawa yang paling sering dipakai adalah helium (He), argon (Ar), nitrogen (N2), hidrogen (H2), dan karbon dioksida (CO2). Syarat gas pembawa harus inert (tidak bereaksi dengan sampel, pelarut maupun kolom), murni, dan mudah didapat.

2. Kolom

Keberhasilan dalam pemisahan, ditentukan juga berdasarkan pemilihan kolom. Kolom dapat terbuat dari tembaga, baja tahan karat, alumunium, atau gelas. Kolom dapat berbentuk lurus, melengkung, atau spiral sehingga dapat menghemat ruang. Ada dua macam kolom yaitu kolom kemas dan kolom kapiler.

3. Fase Diam

Fase diam disapukan pada permukaan dalam medium, seperti tanah diatome dalam kolom atau dilapiskan pada dinding kapiler. Berdasarkan bentuk fisiknya, fase diam yang umum digunakan pada kolom adalah fase diam padat dan cair.

Berdasarkan sifat minyak atsiri yang non polar sampai sedikit polar, untuk analisis sebaiknya digunakan kolom fase diam bersifat polar (CBP-5, CBJ-5, SE-52, dan SE-54). Jika digunakan kolom yang lebih polar, sejumlah puncak yang dihasilkan menjadi lebar (tidak tajam) dan sebagian berekor, garis dasarnya terlihat bergelombang bahkan jika memakai kolom non polar tidak akan terdeteksi sama sekali.

4. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting dalam menentukan keberhasilan analisis GC-MS terutama pada penentuan suhu injektor

dan kolom. Minyak atsiri yang mengandung senyawa monoterpena dan fenol sederhana (memiliki aroma yang sangat merangsang) memberikan hasil yang baik jika suhu kolom diprogram 40° atau 50° sampai 150° atau 200°C dengan kecepatan kenaikan suhu 2° sampai 4°C/menit. Sedangkan untuk minyak atsiri golongan senyawa seskuiterpena (titik didih relatif tinggi), suhu awal kolom 80°C atau 100°C sampai dengan 200° sampai 250°C dengan kecepatan kenaikan suhu sekitar 2°C/menit.

5. Sistem Injeksi

GC-MS memiliki dua sistem pemasukan sampel (injection) yaitu secara langsung (direct inlet) dan sistem kromatografi gas (indirect inlet). Untuk sampel campuran seperti minyak atsiri, pemasukan sampel harus melalui sistem GC, sedangkan untuk sampel murni dapat langsung dimasukkan dalam ruang pengion (direct inlet).

6. Detektor

Detektor GC-MS harus stabil dan tidak merusak senyawa yang dideteksi. Pada sistem alat ini, yang berfungsi sebaga detektor adalah spektrometer massa yang terdiri dari sistem ionisasi dan sistem analisis (Agusta, 2000).

II.2.5 Pengolahan Data

Dari analisis GC-MS akan diperoleh dua informasi dasar, yaitu hasil analisis kromatografi gas yang ditampilkan dalam bentuk kromatogram, dan hasil analisis spektrometri massa yang ditampilkan dalam bentuk spektrum massa. Dari kromatogram diperoleh informasi mengenai jumlah komponen kimia yang terdapat

dalam campuran yang ditunjukkan oleh jumlah puncak. Pada spektrum massa, hasil analisis sistem spektoskopi massa merupakan gambaran jenis dan jumlah fragmen molekul yang terbentuk dari komponen kimia (masing-masing puncak pada kromatogram).

Selanjutnya, spektrum massa komponen kimia yang diperoleh diidentifikasi dengan cara dibandingkan dengan bank data (National Institute, *Standard of Technology* (NIST), dll) (Agusta, 2000). Pendekatan pustaka dapat digunakan identifikasi bila indeks kemiripan atau *Similary Indeks* (SI) berada pada rentang ≥ 80% (Howe, dkk, 1981).

II.3 Antioksidan

II.3.1 Definisi dan Mekanisme Kerja

Radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Elektron yang tidak berpasangan menyebabkan senyawa menjadi reaktif dan mencari pasangan dengan mengikat elektron molekul lain disekitarnya. Target utamanya adalah protein, asam lemak tak jenuh, lipoprotein dan DNA karbohidrat. Radikal bebas ini juga dapat mengubah suatu molekul menjadi radikal bebas.

Mekanisme kerja senyawa radikal bebas ini dengan cara merusak DNA sehingga info genetika berubah dan akan berakibat terjadinya pembentukan sel kanker. Selain DNA, jaringan lipid juga dirusak, terbentuklah peroksida pemicu timbulnya penyakit degeneratif. Untuk menetralisir adanya radikal bebas ini diperlukan senyawa antioksidan. Antioksidan menghambat pembentukan radikal bebas

dengan cara memberikan satu atau lebih elektonnya sehingga dapat mengikat radikal bebas dan molekul-molekul reaktif (Winarsi, 2007).

Mekanisme antioksidan dalam menghambat oksidasi atau menghentikan reaksi berantai pada radikal bebas dari lemak yang teroksidasi, dapat disebabkan oleh 4 mekanisme reaksi, yaitu pelepasan hidrogen dari antioksidan, pelepasan elektron dari antioksidan, adisi lemak ke dalam cincin aromatik pada antioksidan dan pembentukan senyawa kompleks antara lemak dan cincin aromatik dari antioksidan (Ketaren, 2008).

II.3.2 Macam – Macam Antioksidan

Berdasarkan mekanisme reaksinya, antioksidan dikelompokkan menjadi :

1. Antioksidan Primer

Antioksidan ini bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal bebas baru atau mengubah radikal bebas yang telah terbentuk menjadi kurang reaktif. Antioksidan primer disebut juga antioksidan enzimatis. Sebagai antioksidan, enzim-enzim menghambat pembentukan radikal bebas dengan memutus reaksi rantai (polomerisasi) dan mengubahnya menjadi bentuk stabil. Enzim yang termasuk dalam antioksidan primer adalah superoksida dismutase (SOD), katalase, glutation peroksidase (GSH-PX), dan glutation reduktase (GSH-R).

2. Antioksidan Sekunder

Antioksidan ini disebut antioksidan non-enzimatis berupa komponen non-nutrisi dan komponen nutrisi dari sayuran dan buah-buahan. Cara kerjanya dengan memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan menangkapnya sehingga radikal bebas tidak bereaksi dengan komponen seluler. Yang termasuk antioksidan sekunder adalah vitamin E, C, karoten, flavonoid, aam urat, bilirubin, dan albumin.

3. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier meliputi DNA-repair dan metionin sulfoksida reduktase. Enzim tersebut berfungsi dalam perbaikan biomolekuler yang rusak karena reaktivitas radikal bebas. Ciri DNA yang rusak akibat terinduksi senyawa radikal bebas adalah rusaknya *single* dan *double strand* pada gugus basa ataupun non basa (Winarsi, 2007).

II.3.3 Sumber Antioksidan

1. Antioksidan Sintetik

Antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesa reaksi kimia. Contoh antioksidan sintetik adalah *butylated hydroxytoluene* (BHT), *butylated hydroxyanysole* (BHA), *tertbutyl hydroxylquinone* (TBHQ). Antioksidan-antioksidan tersebut merupakan antioksidan alami yang telah diproduksi secara sintetis untuk tujuan komersial (Febriani, 2012).

2. Antioksidan Alami

Antioksidan alami adalah hasil ekstraksi bahan alami. Antioksidan alami di dalam makanan dapat berasal dari : senyawa antioksidan

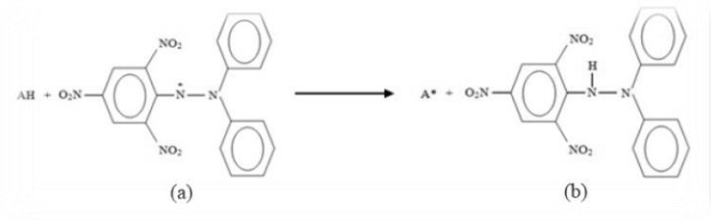
yang sudah ada dari satu atau dua komponen makanan, senyawa antioksidan yang terbentuk dari reaksi-reaksi selama proses pengolahan, senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami dan ditambahkan ke makanan sebagai bahan tambahan pangan (Pratt, 1992).

Contoh antioksidan alami adalah senyawa-senyawa yang terdapat dalam bahan alam/ bahan makanan seperti senyawa-senyawa turunan fenol, flavonoid, vitamin C, dan E (Febriani, 2012). Senyawa antioksidan alami dalam tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik dan polifenolik, seperti golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol, dan asam-asam organik polifungsional (Santoso, 2005).

II.3.4 Metode Pengujian Aktifitas Antioksidan

1. Metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil)

Metode DPPH menggunakan 2,2 difenil-1-pikrilhidrazil sebagai sumber radikal bebas. Prinsipnya adalah reaksi penangkapan hidrogen oleh DPPH dari zat antioksidan dengan reaksi sebagai berikut:



Gambar II.2. Struktur DPPH: (a) DPPH bentuk radikal, (b) DPPH bentuk tereduksi (Sumber: Molyneux, 2004)

Parameter yang umum digunakan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan pada suatu ekstrak bahan adalah dengan menentukan nilai inhibitor concentration 50% (IC_{50}) bahan antioksidan tersebut. IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat aktivitas radikal sebesar 50% (Molyneux, 2004).

2. Metode CUPRAC

Menggunakan bis(neokuproin) tembaga(II) ($Cu(Nc)_2^{2+}$) sebagai pereaksi kromogenik. Pereaksi ($Cu(Nc)_2^{2+}$) yang berwarna biru akan mengalami reduksi menjadi ($Cu(Nc)_2^{2+}$) yang berwarna kuning dengan reaksi:

$n\ (Cu(Nc)_2^{2+}) + A_R\ (OH)_n \rightarrow n\ (Cu(Nc)_2^{2+}) + A_R(=O)_n + n\ H^+$

Secara visual hal ini dapat dilihat dari perubahan warna kompleks larutan dari biru toska menjadi kuning. (Widyastuti, 2010).

3. Metode FRAP

Didasarkan atas kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi senyawa besi(III)-tripiridil-triazin menjadi besi(II)- tripiridil triazin pada pH 3,6. Menggunakan $Fe(TPTZ)_2^{3+}$ kompleks besiligan 2,4,6-tripiridil-triazin sebagai pereaksi. Kompleks biru $Fe(TPTZ)_2^{3+}$ akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi $Fe(TPTZ)_2^{2+}$ yang berwarna kuning dengan reaksi berikut:

$Fe(TPTZ)_2^{3+} + A_ROH \rightarrow Fe(TPTZ)_2^{2+} + H^+ + A_R{=}O$

(Widyastuti, 2010).

II.4 *Microplate Reader* (ELISA)

Microplate reader adalah suatu spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). *Microplate reader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis (Heredia, Adams, Fields, Held, & Harbertson, 2006).

Perbedaan dengan spetrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yag membarasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya antara 400-750 nm. Beberapa *microplate reader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340 – 700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya untuk sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 – 3 mm. suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya suatu system pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian. Saat ini beberapa *microplate reader* menggunakan sistem berkas cahaya ganda (*World Health Organization*, 2008).

BAB III METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental laboratorium yang meliputi penyiapan bahan, isolasi minyak atsiri, analisis komponen minyak atsiri, dan uji aktivitas antioksidan.

Bahan tanaman yang digunakan adalah rimpang *Zingiber ottensii* Val. yang di dapat di daerah Manoko, Lembang, Jawa Barat. Bahan dideterminasi kemudian di sortasi basah dan pencucian.

Isolasi minyak atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. dengan metode destilasi uap air sampai minyak atsiri terekstrak semua. Kemudian destilat dianalisis dengan GC-MS (*Gas Chromatography – Massa Spectrometer*) untuk memperoleh komponen minyak atsiri.

Residu destilasi dikumpulkan dan dikeringan untuk kemudian di maserasi. Ekstrak kental yang didapat dilakukan pengujian terhadap antioksidan.

Minyak atsiri dan ekstrak non atsiri rimpang *Zingiber ottensii* Val. di uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil) secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, minyak atsiri diuji menggunakan lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam silica gel F_{254} dan pengembang bervariasi dari polar sampai non polar, disemprot dengan penampak bercak DPPH 0,2% dalam metanol. Sedangkan secara kuantitatif, pengujian dilakukan dengan metode perendaman radikal bebas DPPH dengan *microplate reader*.