

BAB VI HASIL DAN PEMBAHASAN

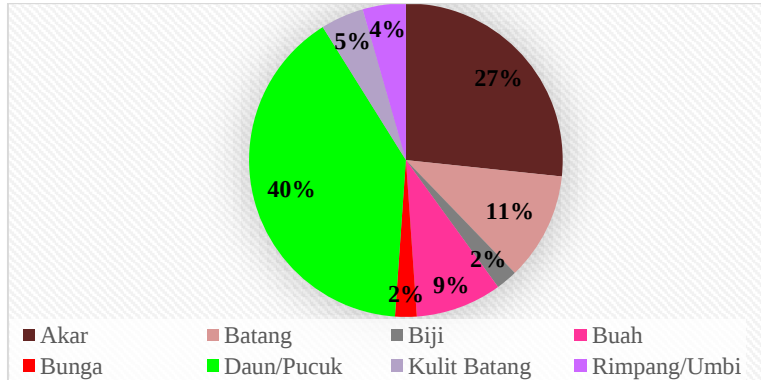
VI.1 Suku Dayak Ngaju

Penelitian ini dilakukan di salah satu Desa yang ada di Kecamatan Bukit Batu, Kota Palangka Raya, Provinsi Kalimantan Tengah yaitu Desa Tangkiling dengan luas daerah 78,64 km² atau 13,75% dari luas kecamatan. Desa Tangkiling memiliki jumlah penduduk 3.066 jiwa. Jarak dari Desa Tangkiling menuju Ibukota 33 km² ditempuh melalui jalur darat (BPS Kota Palangka Raya, 2015).

Informan yang berhasil diwawancarai di Desa Tangkiling berjumlah 3 orang diantaranya adalah Informan 1 selaku Damang serta Informan 2 dan Informan 3 untuk mencari informasi terkait tumbuhan obat yang digunakan oleh Suku Dayak Ngaju. Damang merupakan kepala adat/kepala Desa yang diangkat oleh Bupati yang berperan dalam menjaga kelestarian adat budaya suku Dayak. Informan 2 dan Informan 3 dikenal masyarakat sekitar memiliki pengetahuan akan pengobatan tradisional, dimana memiliki keahlian dalam mengobati berbagai penyakit menggunakan tumbuh-tumbuhan obat. Adapun beberapa pertanyaan yang diajukan kepada narasumber adalah nama tumbuhan, bagian yang digunakan, penyakit yang diobati serta tingkat keseringan penggunaannya.

Masyarakat Suku Dayak Ngaju umumnya menggunakan tumbuhan obat berdasarkan pengalaman tanpa mengetahui jenis senyawa kimia yang terdapat dalam suatu tumbuhan. Hasil wawancara terdapat 35 jenis tumbuhan (lampiran 2) yang umum digunakan oleh Suku Dayak Ngaju untuk mengobati berbagai penyakit yang terdiri dari tumbuhan berpohon, perdu dan semak. Berikut merupakan diagram persentasi

penggunaan bagian tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Suku Dayak Ngaju di Desa Tangkiling.



Gambar VI.1 Persentasi Bagian Tumbuhan yang Digunakan

Penggunaan bagian tumbuhan sebagai pengobatan oleh masyarakat Suku Dayak Ngaju untuk berbagai penyakit cukup beragam, mulai dari bagian daun, batang, kortek, buah, bunga, biji, akar hingga rimpang/umbi. Bagian tumbuhan tersebut dapat digunakan tunggal atau kombinasi dari berbagai bagian tumbuhan untuk mencapai khasiat tertentu. Persentasi terbesar penggunaan bagian tumbuhan berupa daun dan akar yang masing-masing memiliki persentase 40% dan 27%. Persentase penggunaan bagian tumbuhan yang lain lebih rendah seperti bunga dan biji berkisar 2%.

Penggunaan bagian tumbuhan umumnya diaplikasikan dengan cara direbus untuk diminum. Hal ini perlu mendapat perhatian serius karena pada umumnya dosis yang digunakan masyarakat bukan berdasarkan penelitian sehingga meskipun tumbuhan tersebut memiliki khasiat terapi tetapi jika dikonsumsi dengan metode yang

tidak tepat dapat menyebabkan efek atau khasiat yang berkurang bahkan efek samping yang merugikan.

Masyarakat suku Dayak Ngaju memiliki keetnikan tersendiri dalam proses pengambilan tumbuhan obat, salah satunya pengambilan tumbuhan obat dilakukan pada hari Jum'at siang hari. Selain itu, harus memberikan salam kepada penjaga *petak* (tanah) dan *danum* (air) dan mengucapkan “*umba balaku kayu mangayu akan tatamba*” yang artinya “meminta tumbuhan sebagai obat” sebelum memetik atau mencabut tumbuhan obat sambil menyebarkan garam dan paku disekitar tumbuhan obat sebagai syarat pengobatan. Keetnikan yang ditunjukkan dalam pengambilan tumbuhan obat memberikan warna tersendiri dalam budaya masyarakat suku Dayak Ngaju yang menunjukan bahwa masyarakat suku Dayak Ngaju memiliki kebiasaan atau adat dalam memanfaatkan tumbuhan sebagai pengobatan tradisional.

Dalam kehidupan sehari-hari walaupun sudah ada pelayanan kesehatan berupa Puskesmas, masyarakat Suku Dayak Ngaju masih mempraktekkan pengobatan menggunakan tumbuhan obat. Beberapa macam penyakit yang disembuhkan dengan pengobatan tradisional diantaranya adalah demam, diare, kanker, tumor, malaria dan lain-lain. Berdasarkan hasil wawancara, penggunaan terbanyak tumbuhan obat oleh suku Dayak Ngaju adalah untuk mengobati penyakit pencernaan.

Berbagai penyakit dapat dipicu oleh berlebihnya radikal bebas yang dapat merusak sel-sel tubuh. Stres oksidatif adalah kondisi dimana

ketidakseimbangan oksigen radikal dan non-radikal yang dapat merusak sel-sel dengan berbagai mekanisme. Apabila kadar antioksidan tidak memenuhi maka jaringan tidak mampu lagi untuk mengatasi stres oksidatif, melindungi jaringan yang normal dan tidak mampu mengontrol kerusakan yang terjadi sehingga dapat menimbulkan kerusakan yang lebih parah.

VI.2 Penyiapan Bahan

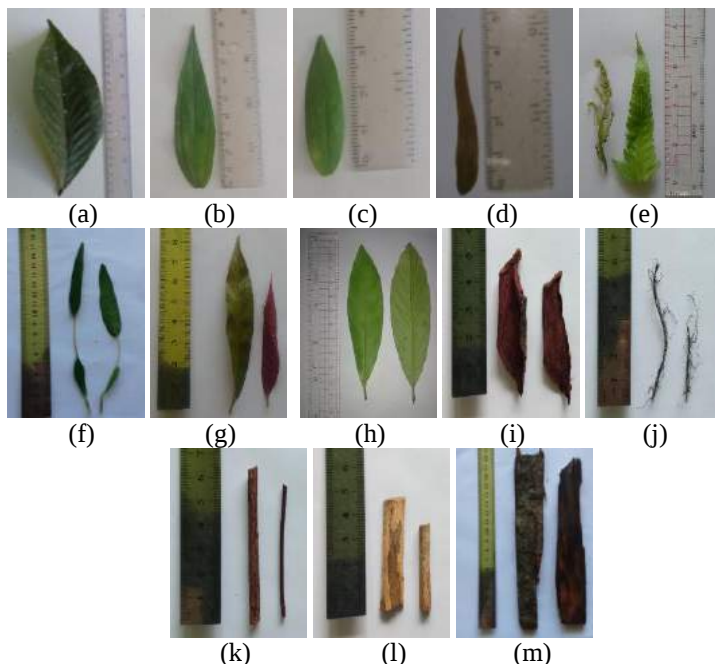
Penyiapan bahan dalam penelitian ini meliputi dari pengumpulan bahan, determinasi hingga pengolahan sampel menjadi simplisia. Dari ke 35 tumbuhan yang diperoleh hasil wawancara di seleksi dengan pertimbangan ketersediaan, kemudahan diperoleh dan bagian yang digunakan, sehingga yang di ambil menjadi sampel pada penelitian ini ada 10 jenis tumbuhan untuk selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan total sampel 13 dan dilakukan determinasi.

Determinasi tumbuhan obat dilakukan di Laboratorium Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung dan Herbarium Bogorensense Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Determinasi ini bertujuan untuk mengetahui kebenaran jenis tumbuhan obat yang diteliti. Kebenaran tumbuhan merupakan syarat penting yang harus dipenuhi dalam penelitian untuk menjamin bahwa tumbuhan yang digunakan adalah benar-benar spesies tumbuhan yang akan digunakan bukan dari spesies lain. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 4.

Tabel VI.1 Hasil Determinasi Tumbuhan Obat

No	Nama Tumbuhan	Spesies	Famili
1	Kalapapa	<i>Vitex pinnata</i> L.	Verbenaceae
2	Karamunting	<i>Melastoma malabathricum</i> L.	Melastomataceae
3	Musisin	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> [Aiton] Hassk	Myrtaceae
4	Kalakai	<i>Stenochlaena palustris</i> (Burm.f.) bedd.	Blechnaceae
5	Bajej	<i>Dizpladium usculentum</i>	Athyriaceae
6	Sambung Maut	<i>Codiaeum variegatum</i> (L.)	Euphorbiaceae
7	Kayu Raja	<i>Excoecaria conchinchinensis</i> Lour	Euphorbiaceae
8	Hati Tanah	<i>Angioteptris</i> sp.	Martiaceae
9	Tampelas	<i>Tetracera poggei</i> Gilg	Dilleniaceae
10	Talatak Manuk	<i>Nephelium mutabile</i> Blume	Sapindaceae

Tumbuhan dikumpulkan pada bulan November-Desember 2019. Proses pengolahan bahan menjadi simplisia melalui beberapa tahapan, dimulai dari sortasi basah yang tujuan untuk memisahkan bahan dari pengotor. Sortasi dilakukan terhadap tanah, kerikil, rumput-rumputan, bagian tumbuhan yang rusak serta bagian tumbuhan lain yang tidak digunakan. Selanjutnya dilanjutkan dengan mencuci bagian bahan dengan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang masih melekat pada bahan.



Gambar VI.2 Makroskopik Tumbuhan Obat, (a) Daun Kalapapa (b) Daun Karamunting (c) Daun Musisin (d) Daun Kalakai (e) Daun Bajej (f) Daun Sambung Maut (g) Daun Kayu Raja (h) Daun Tampelas (i) Umbi Hati Tanah (j) Akar Bajej (k) Ranting Tampelas (l) Kortek Kalapapa (m) Kortek Talatak Manuk

Kemudian dilakukan pengubahan bentuk pada bahan yang bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan agar mempercepat proses pengeringan. Setelah itu dilakukan pengeringan dengan cara alami yakni dengan menjemur bahan di bawah sinar matahari pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$ yang telah ditutupi dengan paranet sehingga terlindung dari cahaya matahari langsung hingga bahan kering selama $\pm 3\text{-}10$ hari dimulai pukul 10.00–15.00 WIB. Proses pengeringan ini bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik, dimana enzim menjadi tidak aktif sehingga tidak terjadi proses penguraian bahan kimia di dalam

simplisia. Selain itu proses pengeringan ini juga berguna untuk mengurangi kandungan air dari simplisia sehingga tidak dapat ditumbuhi jamur. Dengan demikian akan didapatkan simplisia yang awet untuk disimpan dalam jangka waktu yang lama. Dalam proses pengeringan dilakukan dengan menghindari terpaparnya bahan dari panas matahari langsung, hal ini dimaksudkan untuk meminimalisir rusak atau terurainya senyawa-senyawa termolabil serta menghindari rusaknya bahan tumbuhan akibat pemanasan.

Tabel VI.2 Hasil Pengolahan Bahan

No	Sampel	Kode	Berat Segar (gram)	Berat Serbuk (gram)
1	Daun Kalapapa	DKA	2000	950
2	Daun Karamunting	DKG	2000	1250
3	Daun Musisin	DMN	2000	1150
4	Daun Kalakai	DKI	500	100
5	Daun Bajej	DBJ	500	90
6	Daun Sambung Maut	DSM	2000	1350
7	Daun Kayu Raja	DKR	2000	1250
8	Daun Tampelas	DTS	500	100
9	Umbi Hati Tanah	UHT	500	120
10	Akar Bajej	ABJ	500	70
11	Ranting Tampelas	RTS	500	98
12	Kortek Kalapapa	KKA	1500	430
13	Kortek Talatak Manuk	KTM	1500	600

Proses terakhir adalah sortasi kering yang bertujuan untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian tumbuhan yang tidak diinginkan atau pengotor-pengotor lain yang masih tertinggal pada simplisia kering. Simplisia kering yang diperoleh diserbukkan guna memperkecil ukuran dan memperbesar luas permukaan yang berguna pada saat proses ekstraksi. Dengan demikian diharapkan proses ekstraksi kandungan kimia yang terdapat di dalam simplisia menjadi lebih optimal (Depkes RI, 1986). Serbuk simplisia kemudian

disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya matahari. Selanjutnya bahan-bahan yang digunakan tersebut dibuat pengkodean guna mempermudah penulisan dan pengolahannya. Adapun pengkodean tersebut dapat dilihat pada tabel VI.2 Hasil pengolahan bahan.

VI.3 Karakterisasi Simplisia

Karakterisasi simplisia adalah salah satu parameter standarisasi simplisia yang bertujuan untuk mengetahui kualitas atau mutu simplisia yang digunakan. Karakterisasi simplisia yang telah dilakukan adalah pemeriksaan kadar abu total, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol serta susut pengeringan. Penetapan karakterisasi ini dilakukan pada serbuk simplisia.

Penetapan kadar abu total dilakukan untuk mengetahui kandungan mineral internal dan eksternal yang terkandung dalam simplisia yaitu kandungan mineral dan pencemar anorganik, seperti logam-logam alkali, alkali tanah serta silikat yang terkandung pada simplisia (Depkes RI, 2000). Kadar abu yang tinggi menunjukkan tingginya kandungan mineral dan pencemar anorganik pada simplisia. Dari hasil penetapan kadar abu total memberikan hasil terbesar pada daun bajaj yakni 11,56% dan terkecil pada daun musisin yakni 2,48% yang artinya kadar mineral internal dan eksternal yang terdapat pada simplisia adalah sebesar hasil yang didapatkan.

Pemeriksaan kadar sari dilakukan untuk mengetahui berapa persen senyawa dalam simplisia yang tersari oleh air dan etanol. Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar sari larut air diperoleh persentase terbesar

pada simplisia daun kayu raja yakni sebesar 34,79% dan pada hasil pemeriksaan kadar sari larut etanol persentasi terbesar pada simplisia umbi hati tanah yakni sebesar 29,76%.

Tabel VI.3 Hasil Karakterisasi Simplisia

Sampel	Hasil (% b/b)			
	Kadar Abu Total	Kadar Sari Larut Air	Kadar Sari Larut Etanol	Susut Pengeringan
DKA	5,47	12,42	10,57	8,64
DKG	6,87	12,37	16,11	7,78
DMN	2,48	9,01	14,73	7,86
DKI	8,72	11,77	5,07	9,33
DBJ	11,56	7,04	3,48	9,80
DSM	6,14	30,03	18,96	6,17
DKR	6,42	34,79	25,08	6,42
DTS	5,12	7,24	17,45	9,33
UHT	2,74	30,68	29,76	10,16
ABJ	4,03	3,18	1,87	9,18
RTS	4,73	5,03	11,29	6,99
KKA	4,60	13,18	10,82	7,01
KTM	6,61	22,43	21,68	7,77

Susut pengeringan dilakukan pada temperatur 105°C selama kurang lebih 10 menit atau sampai berat konstan. Hasil susut pengeringan yang diperoleh pada simplisia yang terbesar adalah sebesar 10,16% b/b yang terdapat pada Umbi Hati Tanah, dan susut pengeringan terkecil diperoleh sebesar 6,17% b/b yang terdapat pada daun sambung maut. Dari hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa sampel sambung maut mengandung lebih banyak senyawa mudah menguap dan hilang pada kondisi tertentu dibandingkan sampel yang lain.

VI.4 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan sebagai uji kualitatif yang bertujuan untuk mengetahui keberadaan golongan senyawa yang terdapat dalam simplisia. Skrining fitokimia yang dilakukan meliputi pemeriksaan

golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol, kuinon dan triterpenoid/steroid yang terdapat dalam simplisia. Hasil skrining fitokimia simplisia dapat dilihat pada tabel VI.4.

Tabel VI.4 Hasil Skrining Fitokimia Simplisia

Simplisia	Alkaloid	Flavonoid	Saponin	Kuinon	Fenol	Tanin	Steroid-Triterpenoid
DKA	-	+	+	-	+	+	+
DKG	-	+	+	-	+	+	+
DMN	-	+	+	-	+	+	+
DKI	-	+	+	-	+	+	+
DBJ	-	+	+	-	+	-	+
DSM	-	+	+	-	+	-	+
DKR	-	+	+	+	+	+	+
DTS	-	+	+	+	+	+	+
UHT	-	+	+	+	+	+	+
ABJ	-	+	+	-	+	-	+
RTS	-	+	+	-	+	+	+
KKA	-	+	+	-	+	-	+
KTM	-	+	+	+	+	+	+

Keterangan : + = mengandung golongan senyawa yang diuji

- = tidak mengandung golongan senyawa yang diuji

Hasil pengujian diketahui semua simplisia mengandung golongan flavonoid, saponin, fenol dan triterpenoid/steroid. Sedangkan golongan kuinon hanya terdapat pada simplisia daun kayu raja, daun tampelas, umbi hati tanah dan kortek talatak manuk. Pada golongan tanin yang terkandung tanin katekat terdapat pada simplisia daun kalapapa, daun karamunting, daun musisin, daun kalakai, daun tampelas, umbi hati tanah, ranting tampelas dan kortek talatak manuk. Sedangkan untuk tanin katekat dan galat terkandung pada simplisia daun kayu raja.

VI.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu cara untuk mengambil atau menarik komponen kimia yang terkandung dalam sampel dengan

menggunakan pelarut yang sesuai. Ekstraksi dilakukan secara refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Refluks merupakan suatu metode ekstraksi simplisia cara panas dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama kurang waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Pemanasan meningkatkan laju reaksi dan kontak antara pelarut dan simplisia menjadi lebih maksimal. Penggunaan etanol dipertimbangkan sebagai pelarut karena merupakan pelarut yang universal (dapat melarutkan banyak senyawa), kapang dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas dan mudah menguap.

Simplisia ditimbang sebanyak 50 gram dan diekstraksi dengan 300 mL pelarut etanol 96% (1:6). Ekstraksi dilakukan sebanyak 3 kali masing-masing selama 3 jam, bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang lebih banyak. Pengulangan dan pergantian pelarut bertujuan untuk mencegah terjadinya penjenuhan dalam proses ekstraksi.

Ekstrak cair yang diperoleh kemudian dilakukan penyarian dan pemekatan. Pemekatan merupakan peningkatan jumlah senyawa terlarut hingga terbentuk ekstrak yang pekat atau kental, sehingga sebagian besar pelarut dalam ekstrak hilang atau menguap. Pemekatan dilakukan dengan bantuan *rotary vapolator*. *Rotary vapolator* digunakan agar proses pemekatan menjadi lebih cepat serta pelarut yang digunakan dapat diperoleh kembali sehingga lebih efisien. Ekstrak yang telah diperoleh kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terlindung dari cahaya matahari. Rendemen ekstrak dihitung dari bobot ekstrak pekat yang diperoleh, dapat dilihat pada tabel VI.5.

Tabel VI.5 Hasil Rendemen Ekstrak

Sampel	Berat Simplisia (g)	Jumlah Pelarut (mL)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)	BJ* (g/cm ³)
DKA	50,02	900	3,40	6,80	0,809
DKG	50,03	900	8,15	12,28	0,809
DMN	50,03	900	4,98	9,96	0,810
DKI	50,03	900	1,05	2,10	0,808
DBJ	50,03	900	1,13	2,25	0,807
DSM	50,03	900	8,06	16,09	0,808
DKR	50,02	900	9,12	18,24	0,813
DTS	50,01	900	5,70	11,40	0,812
UHT	50,01	900	13,69	27,37	0,804
ABJ	50,01	900	0,77	1,54	0,811
RTS	50,03	900	5,56	11,17	0,814
KKA	50,02	900	4,83	9,66	0,813
KTM	50,01	900	10,91	21,81	0,812

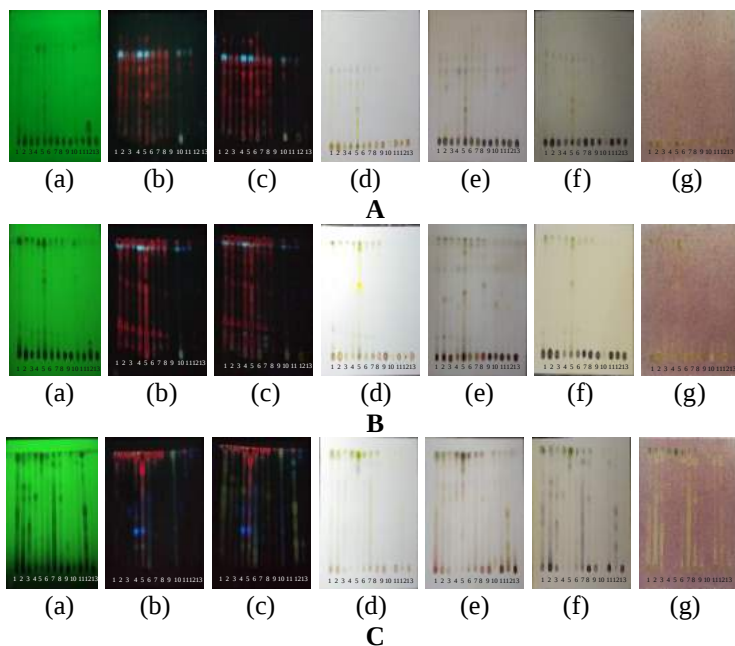
Keterangan : * = Konsentrasi ekstrak 1%

Dari hasil diketahui bahwa rendemen ekstrak paling besar adalah pada ekstrak etanol umbi hati tanah yakni 27,37% dan paling sedikit adalah pada ekstrak etanol akar bajaj yakni 1,54% dengan bj semua ekstrak berada pada rentang 0,804–0,814 g/cm³.

VI.6 Pemantauan Ekstrak

Pemantauan ekstrak bertujuan untuk melihat kandungan golongan senyawa tertentu dan aktivitas antioksidan secara kualitatif yang terdapat pada ekstrak. Pemantauan ini dilakukan terhadap senyawa flavonoid, fenol dan senyawa aktif antioksidan yang terdapat dalam ekstrak. Pemantauan ekstrak menggunakan pelat silika Gel F₂₅₄ dengan fase gerak n-heksana-etil asetat (7:3), kloroform-metanol (9:1) dan etil asetat-asam format-air (8:1:1) dengan penampak bercak yang digunakan adalah H₂SO₄ 10%, AlCl₃ 5%, FeCl₃ 10% dan DPPH 0,2%.

Pada pemantauan ekstrak digunakan tiga jenis fase gerak yang berbeda, hal ini dimaksudkan untuk mencapai semua tingkat kepolaran sehingga fase gerak ini dapat memisahkan bercak yang tingkat kepolarannya berbeda-beda. Dengan demikian dapat memberikan gambaran awal komposisi kandungan kimia berdasarkan pola kromatogram atau pola polaritas dari masing-masing senyawa.



Gambar VI.3 Kromatogram lapis tipis ekstrak, fase diam silika gel F_{254} dan pengembang (A) n-heksana-etil asetat (7:3), (B) kloroform-metanol (9:1), (C) etil asetat-asam format-air (8:1:1), (a) sinar UV 254 nm, (b) sinar UV 365 nm, (c) Penampak Bercak $AlCl_3$ 5%, (d) sinar tampak, (e) penampak bercak H_2SO_4 10 %, (f) penampak bercak $FeCl_3$ 10%, (g) DPPH 0,2%, (1) DKA, (2) DKG, (3) DMN, (4) DKI, (5) DBJ, (6) DSM, (7) DKR, (8) DTS, (9) UHT, (10) ABJ, (11) RTS, (12) KKA, (13) KTM

Berdasarkan hasil pemantauan ekstrak terdapat bercak yang berflouresensi berwarna kuning di bawah sinar lampu UV 365 nm setelah disemprotkan penampak bercak AlCl_3 5% dalam metanol yang menandakan adanya senyawa flavonoid (Wagner dkk., 1996). Pada pelat yang disemprot penampak bercak FeCl_3 10%, terdapat bercak berwarna hitam dengan latar kuning kecoklatan yang menandakan adanya senyawa fenol. Warna kehitaman yang timbul terjadi karena adanya ikatan antara gugus hidroksil pada fenol dengan Fe (Harborne, 1987). Dari hasil pemantauan diperoleh bahwa semua ekstrak positif mengandung senyawa fenol.

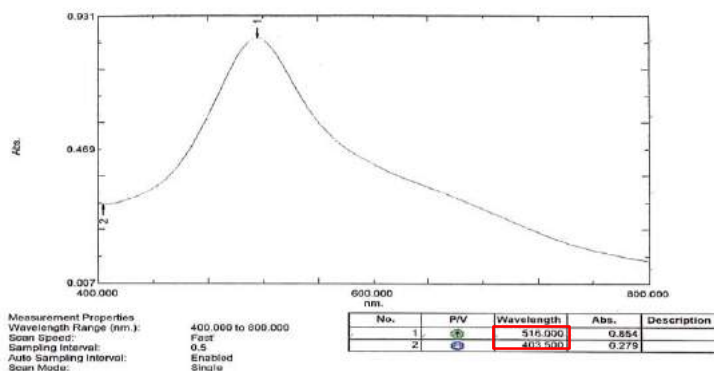
Berdasarkan hasil penyemprotan pelat KLT dengan larutan DPPH 0,2% dalam metanol terbentuk bercak kuning dengan latar belakang ungu menandakan adanya senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Dari hasil pemantauan yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa secara kualitatif ekstrak positif mengandung senyawa antioksidan dilihat dari bercak kuning yang terbentuk. Terbentuknya bercak kuning setelah penyemprotan DPPH 0,2% disebabkan karena adanya senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen didalam ekstrak, sehingga dapat mengakibatkan molekul DPPH teroksidasi yang diikuti dengan menghilangnya warna ungu dari larutan DPPH.

VI.7 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan sampel diuji secara *in vitro* terhadap sampel ekstrak menggunakan *1,1-difenil-2-pikrihidrazil* (DPPH) sebagai radikal bebas. Metode ini memanfaatkan pengukuran serapan DPPH yang teroksidasi oleh larutan uji pada saat inkubasi sehingga diperoleh nilai absorbansi yang lebih rendah dibandingkan nilai

absorbansi kontrol (larutan stok DPPH–Metanol 1:1) (Molyneux, 2004). Metode DPPH ini dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana dan mudah dilaksanakan dalam menetapkan aktivitas antioksidan suatu sampel, dan tidak memerlukan peralatan yang rumit.

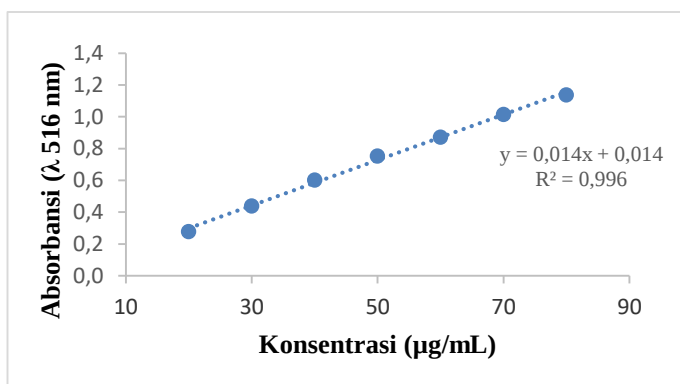
Hal pertama yang dilakukan sebelum pengujian aktivitas adalah optimasi panjang gelombang DPPH dimana dilakukan pada rentang panjang gelombang 400-700 nm. Hasil panjang gelombang DPPH yang diperoleh pada pengujian kali ini yaitu pada λ maksimum 516 nm dalam pelarut metanol sesuai dengan pustaka yang menyatakan bahwa λ maksimal DPPH ada di panjang gelombang 515–520 nm (Molyneux, 2004). Pengukuran serapan selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang tersebut.



Gambar VI.4 Spektrum Panjang Gelombang DPPH

Langkah selanjutnya adalah dibuat kurva kalibrasi larutan DPPH untuk menunjukkan hubungan linieritas antara respon absorbansi larutan dengan konsentrasi larutan DPPH. Selain untuk melihat

hubungan linieritas, dari kurva kalibrasi DPPH dapat digunakan untuk menentukan larutan stok DPPH yang akan digunakan. Konsentrasi yang dibuat untuk kurva kalibrasi yaitu 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80 $\mu\text{g/mL}$ yang dilarutkan dalam metanol. Masing-masing konsentrasi diambil 2 mL dan ditambahkan metanol 2 mL, inkubasi 30 menit ditempat gelap pada suhu kamar untuk mencegah terurainya larutan DPPH, lalu diukur menggunakan spektrofotometer visible. Grafik kurva kalibrasi DPPH dapat dilihat pada gambar VI.5.



Gambar VI.5 Kurva Kalibrasi DPPH

Dari kurva kalibrasi larutan DPPH diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,014x + 0,014$ dengan kuadrat koefisien korelasi (r^2) 0,996, hal ini menunjukkan hubungan yang dihasilkan bahwa penurunan absorbansi terjadi karena adanya penurunan konsentrasi DPPH. Selain itu untuk menentukan konsentrasi kontrol yang digunakan dipilih yang mempunyai nilai absorbansi 0,7–0,8, maka dipilih konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$ untuk digunakan sebagai larutan stok DPPH. Pemilihan nilai absorban bertujuan untuk memaksimalkan penurunan

absorbansi oleh sampel ekstrak dan masih memenuhi hukum Lambert-Beer.

Proses pengujian aktivitas antioksidan selalu diawali pengukuran terhadap absorbansi kontrol (DPPH-Metanol 1:1 v/v) dari larutan DPPH konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$. Absorbansi kontrol merupakan keadaan radikal dimana tidak ada donor proton dari suatu senyawa antioksidan. Larutan kontrol akan menggambarkan respon absorbansi larutan DPPH pada konsentrasi 60 $\mu\text{g/mL}$ sebelum diredam oleh larutan uji.

Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak dimulai dengan melakukan skrining aktivitas antioksidan pada ke 13 sampel uji. Tujuan dari skrining aktivitas antioksidan ini untuk melihat aktivitas antioksidan dari ke 13 sampel yang memiliki % inhibisi di atas 50% untuk dilanjutkan perhitungan nilai IC_{50} sampel. Masing-masing sampel ekstrak dibuat larutan dengan konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ kemudian diambil 2 mL ditambahkan 2 mL larutan stok DPPH 60 $\mu\text{g/mL}$ dibuat secara triplo, kemudian dilakukan inkubasi 30 menit ditempat yang gelap, pada saat inilah terjadi reaksi pendonoran proton yang berasal dari larutan uji yang memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH. Lalu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer visible.

Aktivitas antioksidan sampel ditunjukkan dengan kemampuannya memudarkan warna ungu dari senyawa radikal bebas DPPH dan diukur pada λ 516 nm. Aktivitas antioksidan ini disebabkan karena DPPH memiliki satu atom N yang elektronnya tidak berpasangan

yang apabila bereaksi dengan senyawa antioksidan maka akan terjadi pengikatan elektron dengan atom yang dapat mendonorkan elektronnya (atom H) membentuk *diphenylpicrylhydrazin* yang stabil (Molyneux, 2004).

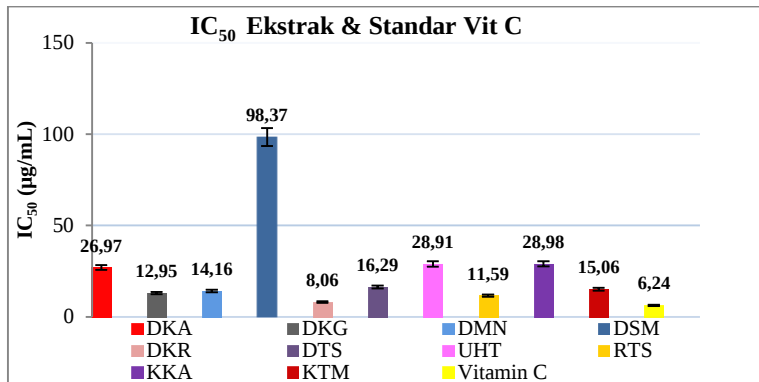
Tabel VI. 6 Skrining Aktivitas Antioksidan

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	% Inhibisi $\pm$ SD
DKA	100	84,53 $\pm$ 0,07
DKG	100	85,34 $\pm$ 1,10
DMN	100	88,05 $\pm$ 0,06
DKI	100	23,37 $\pm$ 0,63
DBJ	100	28,99 $\pm$ 0,63
DSM	100	53,07 $\pm$ 0,69
DKR	100	87,86 $\pm$ 0,19
DTS	100	87,53 $\pm$ 0,19
UHT	100	85,03 $\pm$ 0,01
ABJ	100	18,99 $\pm$ 0,81
RTS	100	88,39 $\pm$ 0,17
KKA	100	86,00 $\pm$ 0,07
KTM	100	86,82 $\pm$ 0,13

Berdasarkan hasil skrining aktivitas antioksidan pada ke 13 ekstrak terdapat 10 ekstrak yang memiliki % inhibisi di atas 50 % dan dilanjutkan ketahap penentuan nilai IC_{50} diantaranya yaitu daun kalapapa, daun karamunting, daun musisin, daun sambung maut, daun kayu raja, daun tampelas, umbi hati tanah, ranting tampelas, kortek kalapapa dan kortek talatak manuk.

Selanjutnya untuk menentukan nilai IC_{50} pada ke 10 sampel uji dengan menggunakan persamaan regresi linier ($y = bx + a$) yang diperoleh dari kurva kalibrasi antara konsentrasi (X) dengan % Inhibisi (Y). Masing-masing ekstrak dibuat 7 konsentrasi dalam metanol, kemudian diperlakukan sama dengan skrining aktivitas

antioksidan. Selanjutnya dibuat kurva kalibrasi dan dihitung nilai IC_{50} dimana nilai y diganti dengan 50. Y merupakan nilai peredaman 50% atau disebut juga variabel tak bebas. X merupakan nilai IC_{50} sampel uji. Nilai IC_{50} ini menunjukkan nilai konsentrasi efektif yang dapat menurunkan 50% radikal bebas DPPH. Semakin kecil nilai IC_{50} berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Hasil uji aktivitas antioksidan pada ekstrak dan standar dapat dilihat pada gambar VI.6.



Gambar VI.6 Hasil Perhitungan IC_{50} Ekstrak dan Vitamin C

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan sampel ekstrak dengan menggunakan metode DPPH secara kuantitatif menunjukkan ekstrak yang dapat meredam radikal bebas dengan sangat kuat karena memiliki nilai IC_{50} pada rentang $<50 \mu\text{g/mL}$ adalah daun Kalapapa, daun karamunting, daun musisin, daun kayu raja, daun tampelas, umbi hati tanah, ranting tampelas, kortek kalapapa dan kortek talatak manuk. Sedangkan ekstrak yang dapat meredam radikal bebas dengan kuat karena memiliki nilai IC_{50} pada rentang $50-100 \mu\text{g/mL}$ adalah

daun sambung maut (Blois, 1958). Absorbansi, % inhibisi serta perhitungan IC_{50} antioksidan serta grafik antara konsentrasi dan % inhibisi dapat dilihat pada lampiran 6.

Pembanding yang digunakan sebagai kontrol positif adalah vitamin C karena vitamin C mempunyai kemampuan menangkal radikal bebas yang sangat baik dan merupakan sumber antioksidan. Selain itu, vitamin C merupakan senyawa murni sehingga aktivitas antioksidannya sangat aktif. Vitamin C memiliki efektifitas antioksidan yang sangat tinggi dikarenakan memiliki sifat polaritas yang tinggi karena mempunyai banyak gugus hidroksil, vitamin C memiliki nilai potensial reduksi yang kecil sehingga lebih mudah mereduksi radikal bebas.

Perbedaan nilai IC_{50} antara masing-masing ekstrak dengan pembanding vitamin C diakibatkan oleh kemampuan masing-masing senyawa dalam memberikan elektron kepada DPPH, semakin banyak elektron yang diberikan kepada DPPH akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansinya yang berarti meningkatnya persen inhibisi dan menurunnya nilai IC_{50} .

Hasil penentuan IC_{50} terhadap sampel ekstrak menunjukkan bahwa kesepuluh sampel aktif sebagai antioksidan. Ini ditunjukkan dengan adanya aktivitas penghambatan radikal bebas DPPH. Aktivitas antioksidan dihasilkan karena simplisia memiliki sejumlah senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, fenol dan tanin. Hal ini diduga karena fenol, flavonoid dan tanin memiliki aktivitas antioksidan (Harborne, 2000; Zhang dkk, 2010).