

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG MASALAH

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan dikulit terluarnya (Winarsih, 2007). Radikal bebas yang mengambil elektron dari DNA dapat menyebabkan perubahan struktur DNA sehingga timbul sel-sel muatan. Bila mutasi ini terjadi berlangsung lama dapat menjadi kanker. Tubuh manusia dapat menetralkan radikal bebas bila jumlahnya tidak berlebihan. Sistem pertahanan tubuh dari radikal bebas adalah antioksidan (Hariyatmi, 2004). Akhir-akhir ini banyak penyakit degeneratif yang diderita oleh masyarakat yang disebabkan oleh terjadinya reaksi radikal. Sebagai contoh penyakitnya antara lain penyakit kanker, penyakit degeneratif, dan penuaan dini (Kumalaningsih, 2006; Youngson, 2005).

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alam maupun senyawa sintetik. Senyawa antioksidan sintetik sudah mulai ditinggalkan karena memiliki sifat karsinogenik dan antioksidan yang berasal dari alam mulai memegang peran penting karena tersedia dalam jumlah yang melimpah dan mempunyai efek samping yang rendah dibandingkan antioksidan sintetik (Kumalaningsih, 2006).

Flavonoid tergolong senyawa metabolit sekunder yang dikenal sebagai *radical scavenger* (Cutler, 2000). Flavonoid mempunyai konsentrasi tinggi yang

terdapat dalam buah-buahan dan sayuran yang cenderung ditemukan pada daun, kulit dan biji.

Daun kelor mengandung senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan yang mampu mengikat reaksi radikal, sehingga mampu menyembuhkan penyakit-penyakit tersebut. Antioksidan alami termasuk flavonoid perlu dikembangkan karena antioksidan sintetik memberikan efek samping yang merugikan bagi kesehatan antara lain kerusakan hati, karsinogenik, dan bersifat toksik (Kikuzaki dkk., 2002).

Penelitian yang dilakukan oleh Putra dkk. (2016) telah mengidentifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol 96% terbukti adanya senyawa aktif flavonoid, saponin, fenolat, triterpenoid, dan tanin.

Maryam dkk. (2016) telah melakukan pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) menggunakan metode FRAP dengan pembandingan asam askorbat. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor sebesar 7,923 mgAAE/g ekstrak. Artinya 1 gram ekstrak mengandung 7,923 asam askorbat / gram ekstrak.

Uji aktivitas antioksidan infusa daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dengan metode DPPH yang dilakukan oleh Nyoman dkk. (2015) menunjukkan bahwa aktivitas infusa daun kelor sebagai antioksidan lebih kecil dibandingkan vitamin C sebagai kontrol positif dengan harga IC_{50} infusa daun kelor sebesar 2.151,33 ppm, sedangkan harga IC_{50} vitamin C sebesar 3,4546 ppm.

Kiswandono dan Maslahat (2011) telah melakukan uji aktivitas antioksidan daun kelor dengan metode DPPH, pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Daun kelor dilakukan fraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut heksana, etil asetat, etanol, metanol 80% dan air, menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanol sebesar 118,19 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan pelarut lainnya yaitu, nilai IC_{50} heksana sebesar 692,39 $\mu\text{g/mL}$, etil asetat sebesar 247,5 $\mu\text{g/mL}$, metanol 80% sebesar 121,79 $\mu\text{g/mL}$, dan air sebesar 189,21 $\mu\text{g/mL}$, sebagai pembanding digunakan kuersetin yaitu sebesar 15,84 $\mu\text{g/mL}$.

Metode penelitian yang dilakukan pada penelitian ini berbeda dengan yang dilakukan oleh Kiswandono dan Maslahat (2011) yaitu dengan menggunakan metode maserasi, sedangkan pada penelitian ini menggunakan metode perkolasi. Metode perkolasi dipilih karena senyawa flavonoid tidak tahan terhadap pemanasan dan untuk mencegah kerusakan komponen senyawa-senyawa oleh suhu yang tinggi, selain itu metode perkolasi memiliki beberapa keuntungan salah satunya adalah tidak terjadi kejenuhan dikarenakan pelarut yang diganti secara terus menerus sampai dihasilkan ekstrak yang banyak (Harbone, 1987).

Shanmugapriya dkk. (2017) telah melakukan analisis flavonoid total dari ekstrak etanol 95% daun kelor dengan metode kolorimetri diperoleh kadar flavonoid total sebesar 0,7073 mgEQ(mg ekuivalen)/ml ekstrak. Hasil penelitian yang saya teliti flavonoid total ekstrak etanol daun kelor diperoleh sebesar 4,52 mgEQ/gram ekstrak.

Berdasarkan latar belakang diatas maka penelitian ini bertujuan untuk uji aktivitas antioksidan daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) menggunakan metode DPPH serta penetapan kadar flavonoid totalnya.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang yang dikemukakan di atas, maka rumusan masalah penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak etanol daun kelor memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, dan seberapa besar potensi antioksidan yang ditunjukkan nilai IC_{50} ?
2. Seberapa besar kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol daun kelor menggunakan metode spektrokolorimetri dengan pereaksi $AlCl_3$ pada panjang gelombang tertentu.

C. MANFAAT PENELITIAN

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah dan informasi secara langsung mengenai manfaat daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) yang mengandung antioksidan yang baik bagi tubuh.

D. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan dilakukanya penelitian ini adalah:

1. Mengetahui adanya aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun kelor dengan metode DPPH, dan mengetahui seberapa besar potensi antioksidan yang ditunjukkan nilai IC_{50}
2. Mengetahui besar kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol daun kelor

E. TINJAUAN PUSTAKA

1. Radikal bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanter, jantung, katarak, serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit (Sibuea, 2003).

2. Antioksidan

a. Pengertian antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menetralkan atau menstabilkan radikal bebas dengan cara melengkapi kekurangan elektron pada radikal bebas tersebut. Substansi ini mampu mencegah terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif (ketidak seimbangan antara prooksidan dan antioksidan). Terdapat tiga macam, mekanisme kerja antioksidan pada radikal bebas, yaitu antioksidan primer yang mampu mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil. Contohnya

adalah superoksida dismutase (SOD), glutathion peroksidase, dan katalase yang dapat mengubah radikal superoksida menjadi molekul air. Antioksidan sekunder berperan mengikat radikal bebas dan mencegah amplifikasi senyawa radikal. Beberapa contohnya adalah vitamin C, vitamin B, vitamin E, betakaroten dan senyawa fitokimia. Antioksidan tersier berperan dalam mekanisme biomolekuler, seperti memperbaiki kerusakan sel dan jaringan yang disebabkan radikal bebas (Kartikawati, 1999).

b. Pengelompokan antioksidan

Menurut Winarno (1997), antioksidan diklasifikasikan menjadi dua jenis yaitu sintetis dan alami.

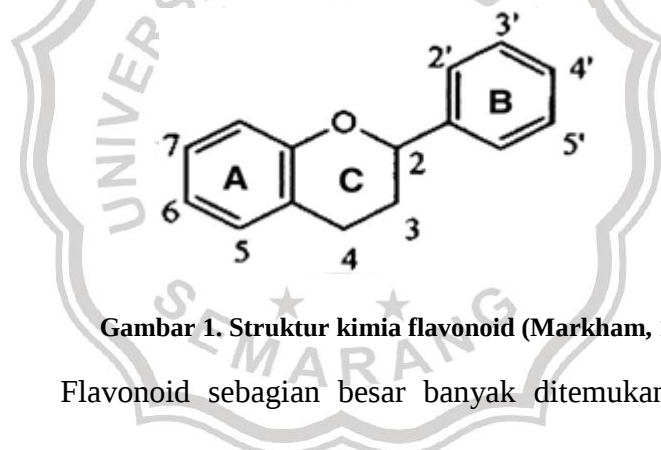
- a. Antioksidan sintetis merupakan antioksidan hasil sintesis reaksi kimia. Beberapa antioksidan sintetis yang sering digunakan butylated hydroxytoluene (BHT), propilgalat (PG), nordihidroguadiretic Acid (NDGA). Antioksidan sintetis tersebut adalah senyawa-senyawa fenol yang biasanya beracun dan memiliki efek samping.
- b. Antioksidasi alami diperoleh dari hasil ekstraksi bahan alami. Contohnya antara lain tokoferol, sesamol, gosipol, dan asam askorbat.

3. Flavonoid

a. Karakteristik flavonoid

Flavonoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki struktur inti C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan dengan 3 atom C, biasanya dengan ikatan atom O yang berupa ikatan oksigen heterosiklik. Umumnya flavonoid ditemukan berikatan dengan gula membentuk glikosida yang menyebabkan senyawa ini lebih mudah larut dalam pelarut polar, seperti metanol, etanol, butanol, dan etil asetat.

Struktur kimia pada flavonoid sebagai berikut:



Gambar 1. Struktur kimia flavonoid (Markham, 1988)

Flavonoid sebagian besar banyak ditemukan dalam bentuk glikosida dimana unit flavonoid terikat pada satu gula. Glikosida adalah kombinasi antara suatu gula dan suatu alkohol yang saling berikatan melalui ikatan glikosida (Lenny, 2006). Flavonoid yang berupa glikosida merupakan senyawa polar sehingga dapat di ekstrak dengan etanol metanol maupun air.

b. Peran flavonoid sebagai antioksidan

Flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dan merupakan pendonor hidrogen yang sangat baik. Flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan lebih baik daripada vitamin C (asam askorbat), vitamin E (tokoferol) yang merupakan antioksidan mayor dalam tubuh (Prakash dan Gupta, 2009).

4. Daun Kelor

a. Klasifikasi daun kelor

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionata
Super Divisio	: Spermatophyta
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Dilleniidae
Ordo	: Capparales
Familia	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Species	: <i>Moringa oleifera</i> Lamk (Depkes RI, 2001)



Gambar 2. Tanaman Kelor (dokumen pribadi)

b. Morfologi

Daun kelor tumbuh dalam bentuk pohon, berumur panjang (perennial) dengan tinggi 7-12 meter. Batang berkayu (lignosus), tegak, berwarna putih kotor. Kulit batangnya tipis dengan permukaan yang kasar. Percabangan simpodial, arah cabang tegak atau miring, cenderung tumbuh lurus dan memanjang. Daun majemuk, bertangkai panjang, tersusun berseling, beranak daun ganjil. Saat muda, helai daun berwarna hijau muda dan setelah dewasa berwarna hijau tua. Bunga muncul di ketiak daun, bertangkai panjang. Kelopak bunga berwarna putih agak krem dan menebar aroma khas. Buah kelor berbentuk segitiga yang memanjang. Buah muda berwarna hijau, setelah tua menjadi coklat. Bentuk biji bulat dan berwarna coklat kehitaman. Akar tunggang, berwarna putih, membesar seperti lobak. Akar, kulit batang, dan daun mengandung saponin dan polifenol. Kulit batang mengandung alkaloida, sedangkan daunnya mengandung minyak atsiri (Depkes RI, 2001).

c. Kandungan Senyawa

Menurut penelitian, daun kelor ternyata mengandung vitamin A, vitamin B, kalsium, kalium, besi, dan protein dalam jumlah sangat tinggi yang mudah dicerna dan diasimilasi oleh tubuh manusia. Tidak hanya itu, tanaman kelor diketahui mengandung lebih dari 40 antioksidan dalam pengobatan

tradisional Afrika dan India serta telah digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mencegah lebih dari 300 penyakit (Krisnadi, 2010).

d. Khasiat daun kelor

Kandungan senyawa aktif dari daun kelor yang telah berhasil diidentifikasi adalah katekol tanin, gallic tanin, steroid, triterpenoid, flavonoid, saponin, antraquinon, alkaloid dan bahan gula (Kasolo dkk., 2010).

5. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kering, kental, atau cair dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang cocok, diluar pengaruh cahaya matahari langsung. Metode ekstraksi dibagi menjadi dua yaitu metode dingin meliputi maserasi dan perkolasi serta metode panas meliputi metode sokletasi, refluks, dekokta, infusa, dan digesti (BPOM RI, 2013).

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru, umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Prinsip perkolasi adalah menempatkan serbuk simplisia pada suatu bejana silonder, yang bagian bawahnya diberi sekat berpori. Proses terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak), dilanjutkan terus menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolasi) yang jumlahnya 1-5 kali bahan (Depkes RI, 2000).

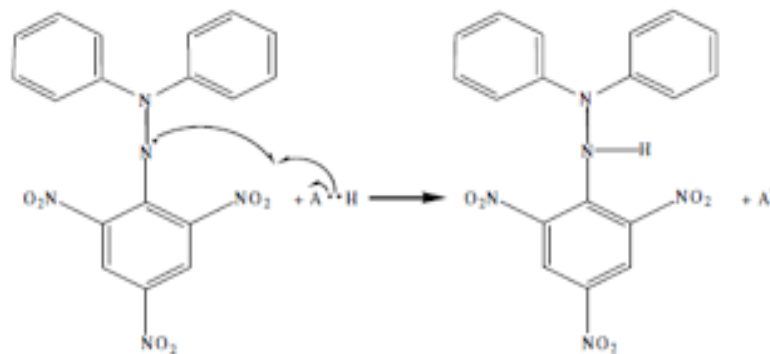
Salah satu pelarut umum yang digunakan dalam ekstraksi adalah metanol dan etanol. Penggunaan pelarut golongan alkohol dapat menarik hampir semua metabolit sekunder yang terdapat didalam simplisia. Jenis komponen yang dapat terekstraksi adalah komponen yang polar, semi polar hingga non-polar (Otsuka, 2006). Keuntungan etanol sebagai penyari adalah lebih selektif, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, etanol dapat bercampur dengan baik dengan air pada segala perbandingan (Depkes RI, 1986).

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

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. Pemudaran warna mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer, sehingga semakin rendah nilai absorbansi maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Semakin pudar warna dan semakin rendah nilai absorbansi menunjukkan bahwa semakin banyak radikal bebas yang bereaksi dengan antioksidan yang terdapat dalam serum (Damayanti, 2004).

Metode DPPH merupakan salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan. Metode ini memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet gelap. Pemerangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian

menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Kuncahyo,2007). Dalam reaksi warna antara DPPH dengan atom H dari senyawa antioksidan dapat dilihat reaksi dibawah ini:



DPPH ox (ungu)

DPPH yellow (kuning)

Gambar 3. Reaksi warna antara DPPH dengan atom H dari senyawa antioksidan (Markham, 1988)

7. Nilai IC_{50}

Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah IC_{50} merupakan konsentrasi larutan substrat yang menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004). Nilai IC_{50} dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu Y, sehingga diperoleh persamaan sebagai berikut :

$$Y = bX + a$$

Harga nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan zat atau senyawa yang bersifat antioksidan. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas suatu antioksidan (Molyneux, 2004).

8. Spektrofotometri sinar tampak

Spektrofotometri sinar tampak (Uv-Vis) adalah pengukuran energy cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu (Day, 2002). Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (Visible) mempunyai panjang gelombang antara 400-750 nm. Spektrofotometri digunakan untuk mengukur besarnya energi yang diabsorbansi atau diteruskan. Sinar radiasi monokromatik akan melewati larutan yang mengandung zat yang dapat menyerap sinar radiasi tersebut (Harmita, 2006). Pengukuran spektrofotometri menggunakan alat spektrofotometer yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Konsentrasi dari analit didalam larutan bias ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer (Rohman, 2007).

Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan antara absorban dengan konsentrasi larutan analit berbanding terbalik dengan transmitan.

Rumus Lambert-Beer (Rohman, 2007) adalah sebagai berikut :

$$A = abc$$

Keterangan :

A = absorban

a = absorptivitas

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

F. LANDASAN TEORI

Penelitian yang dilakukan oleh Putra dkk. (2016) telah mengidentifikasi senyawa kimia ekstrak etanol daun kelor dengan menggunakan pelarut etanol 96% terbukti adanya senyawa aktif flavonoid, saponin, fenolat, triterpenoid, dan tanin.

Maryam dkk. (2016) telah melakukan pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) menggunakan metode FRAP dengan pembanding asam askorbat. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kelor sebesar 7,923 mgAAE/g ekstrak. Artinya 1 gram ekstrak mengandung 7,923 asam askorbat / gram ekstrak.

Uji aktivitas antioksidan infusa daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dengan metode DPPH yang dilakukan oleh Nyoman dkk. (2015) menunjukkan bahwa aktivitas infusa daun kelor sebagai antioksidan lebih kecil dibandingkan vitamin C sebagai kontrol positif dengan harga IC_{50} infusa daun kelor sebesar 2.151,33 ppm, sedangkan harga IC_{50} vitamin C sebesar 3,4546 ppm.

Kiswandono dan Maslahat (2011) telah melakukan uji aktivitas antioksidan daun kelor dengan metode DPPH, pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi. Daun kelor dilakukan fraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut heksana, etil asetat, etanol, metanol 80% dan air, menunjukkan bahwa nilai IC_{50} ekstrak etanol sebesar 118,19 $\mu\text{g/mL}$, sedangkan pelarut lainnya yaitu, nilai IC_{50} heksana sebesar 692,39 $\mu\text{g/mL}$, etil asetat sebesar 247,5 $\mu\text{g/mL}$, metanol 80% sebesar

121,79 $\mu\text{g/mL}$, dan air sebesar 189,21 $\mu\text{g/mL}$, sebagai pembanding digunakan kuersetin yaitu sebesar 15,84 $\mu\text{g/mL}$.

Shanmugapriya dkk. (2017) telah melakukan analisis flavonoid total dari ekstrak etanol 95% daun kelor dengan metode kolorimetri diperoleh kadar flavonoid total sebesar 0,7073 mgEQ(mg ekuivalen)/ml ekstrak. Hasil penelitian yang saya teliti flavonoid total ekstrak etanol daun kelor diperoleh sebesar 4,52 mgEQ/gram ekstrak.

G. HIPOTESIS

1. Ekstrak etanol daun kelor memiliki aktivitas antioksidan.
2. Ekstrak etanol daun kelor mengandung kadar flavonoid total tertentu dengan penetapan menggunakan metode spektrokolorimetri dengan pereaksi AlCl_3 pada panjang gelombang tertentu.