

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Pengambilan Sampel Bahan Tumbuhan

Bahan segar diperoleh dari Desa Cicara Kecamatan Pasirwangi Kabupaten Garut. Bahan daun kentut di determinasi di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati di Insitut Teknologi Bandung (ITB). Hasil determinasi menyatakan bahwa daun segar yang digunakan adalah *Paederia foetida* L. dengan nama umum daun kentut (**Lampiran 1**).

5.2. Pemeriksaan Makroskopik

Pemeriksaan makroskopik pada daun kentut menunjukkan daun tunggal dengan panjang daun pada rentang 8-17 cm dan lebar 3-5,5 cm. Bentuk daun bulat telur, pangkal daun berbentuk jantung, ujung daun lancip, pinggir daun rata, permukaan atas berbulu. Hasil pemeriksaan makroskopik ini sesuai dengan Depkes (1989:337) yang menyatakan daun kentut tunggal, berbentuk bundar telur sampai lonjong, pangkal daun berbentuk jantung, ujung daun lancip, pinggir daun rata. Permukaan atas berambut warna coklat kehitaman serta berambut rapat atau jarang, permukaan bawah berwarna kelabu kecoklatan dan terasa lebih halus dan berambut, tulang daun menyirip, tulang daun pada permukaan bawah lebih menonjol daripada permukaan atas (**Lampiran 2**).

5.3. Pemeriksaan Mikroskopik

Hasil dari pengujian mikroskopik penampang melintang daun kentut dan serbuk simplisia menggunakan reagen kloralhidrat (**Lampiran 3**). Komponen mikroskopik daun kentut segar sebagai fragmen pengenalan di antaranya terdapat rambut penutup di atas, palisade, bunga karang, epidermis atas, epidermis bawah, berkas pembuluh. Sedangkan pada serbuk simplisia daun kentut terlihat berkas pembuluh, rambut penutup, dan kristal yang tersebar di seluruh jaringan (**Lampiran 3**). Fragmen daun kentut ini sesuai dengan buku *Materia Medika Indonesia* (Depkes,1989:378)

5.4 Parameter Standar Simplisia dan Ekstrak

5.4.1. Parameter standar simplisia

Pengujian parameter standar simplisia meliputi organoleptik, penetapan susut pengeringan, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu yang tidak larut asam, penetapan kadar air, penetapan kadar sari larut air, penetapan kadar sari larut etanol.

Pengujian organoleptik dilakukan pada simplisia dan ekstrak daun kentut. Organoleptik bertujuan untuk pengenalan awal yang sederhana dan seobyektif mungkin pada simplisia. Hasil pengamatan parameter organoleptik dapat terlihat pada **Tabel V.1**.

Tabel V.1. Parameter organoleptik simplisia daun kentut

Parameter Organoleptik	Simplisia
Bentuk	Serbuk
Warna	Hijau kecoklatan
Bau	Berbau khas
Rasa	Pahit

Selain pengujian organoleptik dilakukan pula pengukuran beberapa parameter untuk simplisia yaitu kadar air, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol. Hasil dapat dilihat pada **Tabel V.2**

Tabel V.2. Parameter standar simplisia daun kentut

Parameter Standar Simplisia	Hasil (%)
Kadar air	4,24
Susut pengeringan	9,34
Kadar abu total	6,84
Kadar abu tidak larut asam	0,89
Kadar sari larut etanol	14,25
Kadar sari larut air	9,98

Penetapan kadar air pada simplisia menggunakan metode destilasi azeotroph. Penetapan kadar air bertujuan untuk mengetahui kandungan air dalam simplisia. Kandungan air yang terdapat dalam simplisia dibatasi karena air merupakan media yang baik untuk pertumbuhan mikroorganisme yang dapat menurunkan hingga merusak simplisia. Hasil dari penetapan kadar air daun kentut yaitu 4,49%. Kadar air simplisia daun kentut ini memenuhi syarat karena kurang dari 10%.

Penetapan susut pengeringan bertujuan untuk melihat senyawa-senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil dari penetapan susut pengeringan pada daun kentut sebesar 9,56%.

Penetapan kadar abu menggunakan prinsip pemanasan bahan pada temperatur yang menyebabkan senyawa organik dan turunannya terdestruksi dan menguap sehingga yang tertinggal unsur mineral dan zat anorganik. Penetapan kadar abu bertujuan memberikan gambaran kandungan mineral dan zat anorganik yang terdapat dalam daun kentut (internal) maupun dari proses pengolahan simplisia (eksternal). Hasil penetapan kadar abu total daun kentut yaitu 6,84% , memenuhi syarat kadar abu total daun kentut tidak lebih dari 7% (Depkes RI,1989:378). Hasil penetapan kadar abu yang tidak larut asam daun kentut berada yaitu 0,89%, kadar abu yang tidak larut asam tidak lebih dari 2% (Depkes RI,1989:378) sehingga kadar abu tidak larut asam memenuhi syarat. Hal ini menunjukkan bahwa cemaran logam maupun mineral eksternal pada daun kentut dalam batas aman.

Pada pengujian kadar sari larut air ditambahkan kloroform karena air merupakan media untuk pertumbuhan mikroba sehingga penambahan kloroform digunakan sebagai antimikroba. Pemeriksaan kadar sari dilakukan untuk mengetahui kandungan yang tersari dalam pelarut air dan etanol dan juga memberikan gambaran awal jumlah kandungan senyawa di dalam simplisia. Hasil parameter kadar sari menunjukkan lebih banyak senyawa kimia yang tersari dalam pelarut etanol dibandingkan air.

Hasil kadar sari larut etanol menunjukkan hasil yang lebih besar dibandingkan air. Hal ini disebabkan senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun kentut lebih banyak bersifat kurang polar. Senyawa yang terdapat dalam daun kentut yaitu flavonoid, fenol, kuinon, steroid, monoterpen, seskuiterpen. Kadar sari larut air yang diperoleh sebesar 9,98%, kadar sari larut air daun kentut tidak kurang dari 21% (Depkes RI,1989:378), sehingga kadar sari larut air pada daun kentut di bawah nilai ketentuan. Pada pengujian kadar sari larut air menggunakan cara ekstraksi dingin sehingga senyawa yang tersari tidak maksimal karena flavonoid lebih larut dalam air panas, selain itu senyawa fenol memiliki kelarutan yang rendah dalam air, kelarutannya tinggi pada pelarut organik yang bersifat polar (Robinson,1995:57). Senyawa steroid, monoterpen dan seskuiterpen merupakan senyawa yang sukar larut dalam air. Sedangkan pada kadar sari larut etanol daun kentut diperoleh 14,25% , kadar sari larut etanol tidak kurang dari 5% (Depkes RI,1989:378) dan hasil tersebut memenuhi standar Dirjen POM.

5.4.2. Parameter standar ekstrak

Parameter standar yang dilakukan pada ekstrak yaitu parameter organoleptik ekstrak dan parameter bobot jenis (Bj). Hasil parameter organoleptik ekstrak dapat dilihat pada **Tabel V.3**

Tabel V.3. Parameter organoleptik ekstrak

Parameter Organoleptik	Ekstrak
Bentuk	Ekstrak kental
Warna	Coklat kehitaman
Bau	Berbau khas
Rasa	Pahit

Bobot jenis adalah massa per satuan volume pada suhu kamar yang ditentukan dengan alat khusus. Pengujian bobot jenis ini bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia terlarut. Hasil pengujian bobot jenis pada daun kentut yaitu 0,71 (**Lampiran 9**).

5.5. Penapisan Fitokimia

Pengujian penapisan fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa terkandung pada simplisia daun kentut. Hasil penapisan fitokimia simplisia daun kentut dapat dilihat pada **Tabel V.4**

Tabel V.4. Penapisan fitokimia simplisia daun kentut

Golongan senyawa	Simplisia
Alkaloid	-
Fenolat	+
Flavonoid	+
Tanin	-
Kuinon	-
Saponin	-
Monoterpen dan sesquiterpen	-
Steroid	+

Keterangan :

(+) = Terdeteksi

(-) = Tidak terdeteksi

Hasil penapisan fitokimia pada simplisia daun kentut terdeteksi golongan senyawa fenolat, flavononoid, dan steroid.

5.6. Ekstraksi dan Pemekatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan serbuk simplisia daun kentut. Proses ekstraksi dilakukan dengan mengekstraksi 1 kg simplisia daun kentut dengan etanol 96% sebanyak 20 L selama 3 hari dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Hal ini dilakukan untuk menghindari penjenuhan pelarut dalam menarik senyawa-senyawa yang terdapat pada daun kentut.

Ekstrak cair yang diperoleh dari proses maserasi ini adalah 6 liter. Pemekatan ekstrak menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut. Setelah itu dipekatkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh yaitu 67,7656 gram.

Pada ekstrak dilakukan penapisan fitokimia seperti halnya yang dilakukan pada simplisia daun kentut. Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak dapat dilihat pada

Tabel V.5

Tabel V.5 Penapisan fitokimia ekstrak daun kentut

Golongan senyawa	Ekstrak
Alkaloid	-
Fenolat	+
Flavonoid	+
Tanin	-
Kuinon	+
Saponin	-
Monoterpen dan sesquiterpen	+
Steroid	+

Keterangan:

(+)

= Terdeteksi

(-)

= Tidak terdeteksi

Hasil penapisan fitokimia pada ekstrak daun kentut terdeteksi golongan fenolat, flavonoid, kuinon, monoterpen dan seskuiterpen, dan steroid.

5.7. Fraksinasi

Sebanyak 40 gram ekstrak kental etanol ditambahkan dengan sedikit etanol untuk membantu kelarutan, kemudian ditambahkan air panas sebanyak 120 ml. Setelah larut maka ditambahkan n-heksan 120 mL (1:1), kemudian setelah terpisah diambil lapisan n-heksan, dilakukan kembali penambahan n-heksan pada fraksi air sebanyak 120 mL. Setelah itu ditambahkan etil asetat pada fraksi air

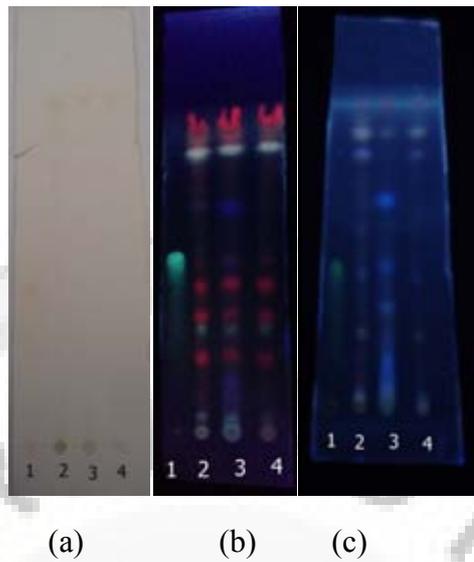
sebanyak 120 mL, setelah terpisah diambil fraksi etil asetatnya kemudian dilakukan penambahan etil asetat kembali sebanyak 120 mL ke fraksi air. Fraksi air kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 120 mL, kemudian diambil. Karena etanol dan air larut sehingga tidak terjadi pemisahan. Fraksi-fraksi yang diperoleh yaitu fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi etanol.

Setelah diperoleh fraksi, dilakukan pemekatan menggunakan *vacuum rotary evaporator* untuk memisahkan fraksi dengan pelarut. Setelah itu dipekatkan di *waterbath* dengan suhu 38⁰C. Hal ini dilakukan agar senyawa yang terdapat dalam fraksi tidak rusak dengan pemanasan yang tinggi.

5.8. Pemantauan KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Pemantauan KLT dilakukan terhadap ekstrak, fraksi etanol, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan serta kuersetin sebagai pembanding yang ditotolkan pada plat KLT silika gel GF 254 dengan pengembang kloroform:etil asetat (4,5:5,5) diperoleh nilai Rf 0,375. Serta fraksi etanol dengan pengembang etil asetat:etanol:air (7,5:1.5:1) diperoleh nilai Rf 0,75. Hasil KLT dapat terlihat pada

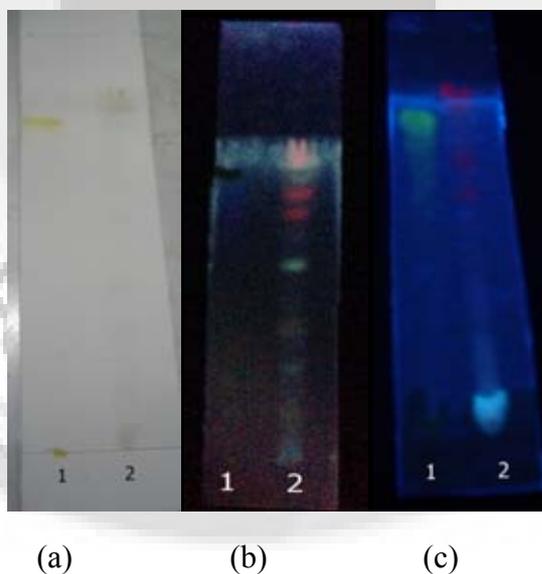
Gambar V.1 dan V.2



Gambar V.1. Pola kromatogram pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan fase diam silika gel GF 254 dengan pengembang kloroform: etil asetat (4,5:5,5) menggunakan penampak bercak a) H_2SO_4 sinar tampak b) AlCl_3 sinar UV 365nm c) Sitroborat sinar UV 365 nm

Keterangan :

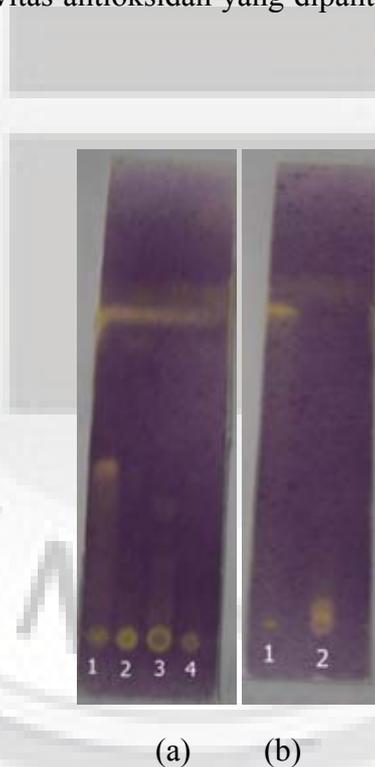
- | | |
|--------------------|-----------------------|
| 1 = Kuersetin | 3= Fraksi etil asetat |
| 2 = Ekstrak etanol | 4= Fraksi n-heksana |



Gambar V.2. Pola kromatogram pemantauan fraksi etanol menggunakan fase diam silika gel GF 254 dengan pengembang etil asetat:etanol:air (7,5: 1,5:1) menggunakan penampak bercak a) H_2SO_4 sinar tampak b) AlCl_3 sinar UV 365nm c) Sitroborat sinar UV 365 nm.

Keterangan : 1 = Kuersetin 2 = Fraksi etanol

Penggunaan H_2SO_4 10% dalam metanol sebagai penampak bercak *universal* untuk mendeteksi semua golongan senyawa dan dilakukan pemanasan sehingga terlihat senyawa-senyawa yang terdapat dalam sampel dari bercak noda yang ditimbulkan. AlCl_3 dan sitroborat (asam sitrat dan asam borat) untuk golongan spesifik flavonoid. Warna bercak yang positif flavonoid menunjukkan warna kuning pada kedua penampak bercak. Di samping itu digunakan larutan DPPH 0,2% dalam metanol sebagai penampak bercak untuk mengidentifikasi keberadaan dari senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dari ekstrak maupun fraksi. Hasil uji kualitatif aktivitas antioksidan yang dipantau dengan KLT dapat terlihat pada **Gambar V.3**



Gambar V.1. Pola kromatogram pemantauan ekstrak dan fraksi menggunakan fase diam silika gel GF 254 dan aktivitas antioksidan menggunakan DPPH menggunakan pengembang a) Kloroform:etil asetat (4,5:5,5) , b) Etil asetat:etanol:air (7,5:1,5:1).

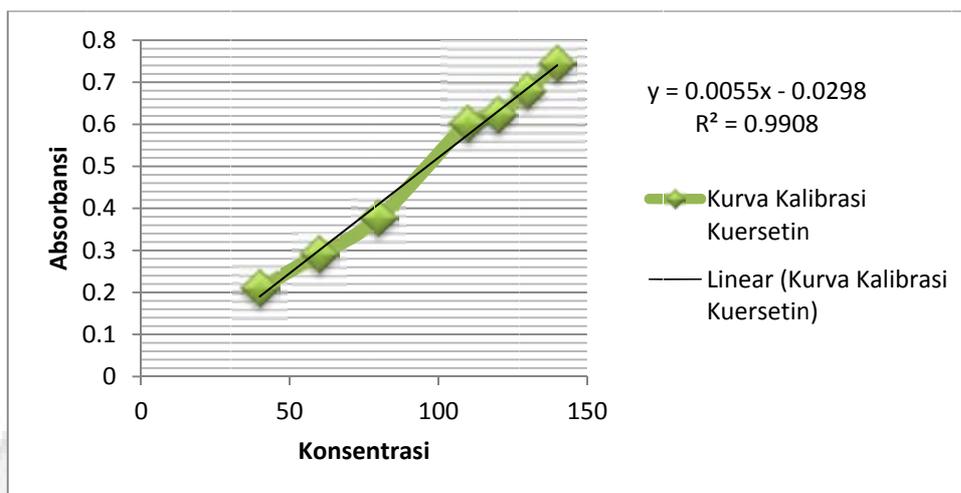
Keterangan : (a) 1= Kuersetin, 2= Ekstrak etanol, 3= Fraksi etil asetat, 4= Fraksi n-heksan

(b) 1 = Kuersetin, 2= Fraksi etanol

Hasil uji kualitatif antioksidan yang dipantau dengan KLT menggunakan dapat terlihat dari kondisi plat yang berwarna ungu semakin lama semakin memudar sebagai tanda adanya efek reduksi yang dilakukan oleh sampel yang bersifat antioksidan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak serta fraksi daun kentut memiliki aktivitas antioksidan.

5.9. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Dilakukan terlebih dahulu penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin sebagai pembanding dan digunakan untuk membuat kurva kalibrasi. Penetapan kadar menggunakan metode Chang (2002). Sebanyak 12,5 mg kuersetin dilarutkan dalam methanol 25 mL menjadi konsentrasi 500 ppm kemudian dilakukan pengenceran konsentrasinya menjadi 40, 50, 60, 80, 100, 110, 120, 130 dan 140 ppm. Kuersetin diambil sebanyak 0,5 mL ditambahkan dengan 1,5 mL metanol, 0,1 mL $AlCl_3$, 0,1 mL natrium asetat dan 2,8 mL aquadest. Dilakukan terlebih dahulu penetapan panjang gelombang maksimum dan diperoleh pada konsentrasi 140 ppm yang menunjukkan nilai absorbansi tertinggi yaitu 0,746 pada panjang gelombang 426 nm. Sehingga rangkaian pengujian kadar flavonoid menggunakan panjang gelombang 426 nm. Kurva kalibrasi kuersetin dapat terlihat pada **Gambar V.4**



Gambar V.4. Kurva Kalibrasi Kuersetin

Larutan sampel berupa ekstrak dibuat konsentrasinya menjadi 10000 ppm, fraksi etanol pada konsentrasi 11000 ppm, fraksi etil asetat pada konsentrasi 12000 ppm dan fraksi n-heksan 8000 ppm. Kemudian sampel baik itu ekstrak maupun fraksi ditambahkan dengan 1,5 mL metanol, 0,1 mL $AlCl_3$, 0,1 mL natrium asetat dan 2,8 mL aquadest, diinkubasi 30 menit. Diukur nilai absorbannya dengan Spektrofotometer UV sinar tampak pada panjang gelombang 426 nm. Larutan blanko yang digunakan adalah metanol. Kandungan flavonoid total pada ekstrak maupun fraksi dibandingkan dengan kuersetin dan diperoleh data yang terdapat pada **Tabel V.6**

Tabel V.6. Kadar flavonoid total pada ekstrak serta fraksi daun kentut

Sampel	Kadar flavonoid total (%)
Ekstrak etanol	1,562 ± 0,011
Fraksi etanol	0,686 ± 0,014
Fraksi etil asetat	0,987 ± 0,004
Fraksi n-heksan	1,283 ± 0,009

Sehingga dapat diketahui bahwa pada ekstrak etanol daun kentut kadar flavonoid paling tinggi yaitu 1,562%, kemudian fraksi n-heksan dengan 1,283% fraksi etil asetat 0,987% dan fraksi etanol dengan kandungan paling rendah yaitu 0,686%. Pada ekstrak kandungan flavonoidnya paling tinggi karena fraksi mengalami penyederhanaan kandungan berdasarkan kepolaran sehingga senyawa-senyawa dapat terlarut pada tingkat kepolarannya. Dari data ini dapat dilihat bahwa senyawa-senyawa flavonoid yang ada pada daun kentut bersifat semipolar hingga non polar hal ini terlihat dengan nilai kadar flavonoid yang tinggi pada fraksi pelarut semi polar dan non polar. Sedangkan kadar flavonoid pada fraksi etanol kadar flavonoid rendah hal ini disebabkan banyak senyawa yang tidak tertarik atau sedikit tertarik oleh etanol.

5.10. Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan terlebih dahulu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum DPPH pada spektrofotometer sinar tampak pada rentang 400-600 nm. Hasil penentuan panjang gelombang maksimum DPPH pada konsentrasi 50 ppm dengan panjang gelombang 515 nm, sehingga seluruh pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada panjang gelombang 515 nm.

Sampel berupa ekstrak dan fraksi dibuat dalam konsentrasi 500 ppm sebagai larutan induk kemudian dilakukan rangkaian seri pengenceran 400, 300, 200, 100, 50 ppm. Kemudian serangkaian sampel tersebut ditambahkan dengan DPPH yaitu dengan mengambil sampel sebanyak 1,5 mL dan DPPH 1,5 mL hal ini dilakukan agar perbandingan sampel dengan DPPH (1:1) dalam vial coklat hal ini dilakukan untuk meminimalisir cahaya yang dapat menyebabkan kestabilan

DPPH berubah. Diinkubasi selama 30 menit tanpa pengocokan agar DPPH dapat bereaksi secara alami dengan sampel. Setelah itu diukur nilai absorbannya menggunakan Spektrofotometer UV sinar tampak pada panjang gelombang 515 nm.

Aktivitas antioksidan dapat diketahui dari nilai absorbansi yang diperoleh sampel lalu dibandingkan dengan nilai absorbansi kontrol. Aktivitas antioksidan ini adalah kemampuan sampel untuk meredam radikal bebas yaitu DPPH yang hasilnya dalam bentuk persen (%) sedangkan absorbansi kontrol menggunakan larutan DPPH dan metanol sebagai blanko dengan perbandingan yang sama (1:1). Setelah diperoleh nilai absorbansi sampel dan nilai absorbansi kontrol maka dapat diketahui aktivitas antioksidan dari sampel dengan menggunakan persamaan:

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

Setelah diperoleh aktivitas antioksidan atau %inhibisi dalam meredam radikal bebas, dapat diketahui pula IC₅₀. IC₅₀ merupakan parameter menentukan aktivitas antioksidan dengan menjelaskan konsentrasi yang dapat menghambat 50% aktivitas radikal bebas DPPH.

Vitamin C digunakan sebagai pembanding antioksidan. Karena vitamin C merupakan antioksidan kuat. Vitamin C dibuat dalam konsentrasi 50 ppm kemudian dilakukan pengenceran 3, 4, 5, 6 dan 7 ppm. Kemudian ditambahkan DPPH dengan perbandingan (1:1) pada masing-masing konsentrasi vitamin C.

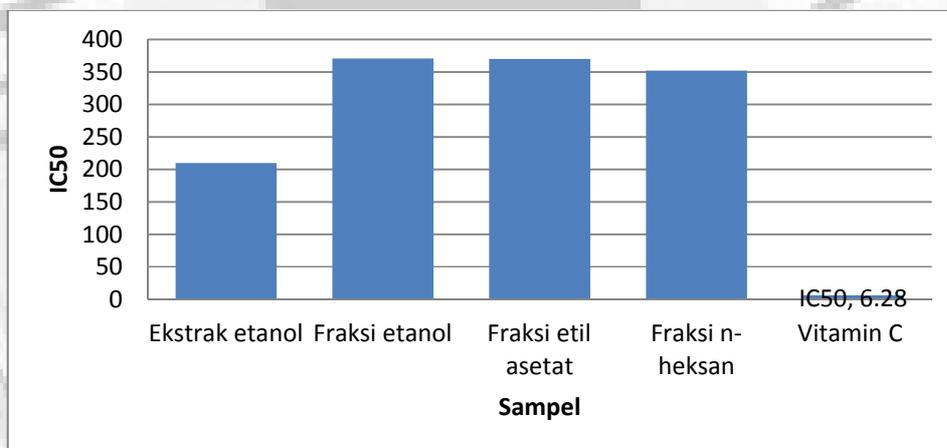
Aktivitas antioksidan sampel dibandingkan dengan vitamin c dapat terlihat pada **Tabel V.7**

Tabel V.7. Tabel aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun kentut

Sampel	Aktivitas antioksidan	
	% inhibisi	IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak etanol	37,16	209,87
Fraksi etanol	11,47	370,83
Fraksi etil aasetat	12,2	369,92
Fraksi n-heksan	15,81	352,02
Vitamin C	45,64	6,28

Dari tabel di atas terlihat ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu 37,16% dengan IC₅₀ 209,87µg/mL dan yang paling terendah yaitu fraksi etanol 11,47% dengan IC₅₀ 370,83 µg/mL. Nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi daun kentut dibandingkan dengan nilai IC₅₀ vitamin c, dapat terlihat pada

Gambar V.5



Gambar V.5. Diagram aktivitas antioksidan ekstrak serta fraksi daun kentut

Berdasarkan diagram di atas aktivitas antioksidan ekstrak etanol adalah 0,02 kali Vitamin C, fraksi etanol 0,017 kali Vitamin C, fraksi etil aasetat 0,017 kali Vitamin C dan fraksi n-heksan 0,018 kali vitamin C. Hal ini menunjukkan ekstrak serta fraksi daun kentut memiliki aktivitas antioksidan yang lemah karena IC₅₀ diatas 150µg/mL.