**PROPOSAL PENELITIAN MANDIRI**

PENETAPAN KADAR FENOL, FLAVONOID DAN KAROTENOID DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN JINTAN HITAM (*Nigella* *sativa* L)

MUKHRIANI

19760117 200912 2 001

JURUSAN FARMASI

FAKULTAS ILMU KESEHATAN

UIN ALAUDDIN MAKASSAR

2014

 **BAB I**

**PENDAHULUAN**

**A. Latar Belakang**

Indonesia merupakan salah satu negara negara dengan tingkat polusi udara tertinggi didunia. Kontribusi emisi gas buang kendaraan bermototr sebagai sumber polusi udara terbesar mencapai 60-70%, dibanding dengan industri yang hanya berkisar antara 10-15%. Sedangkan sisanya berasal dari rumah tangga, pembakaran sampah, kebakaran hutan dan lain- lain. Hal ini diakibatkan oleh laju pertumbuhan kepemilikan kendaraan bermotor yang tinggi. Sebagian besar kendaraan bermotor tersebut menghasilkan emisi gas buang yang buruk, baik akibat perawatan yang kurang memadai ataupun dari penggunaan bahan bakar dengan kualitas kurang baik (Irawan,2012).

Menurut *Environmental Protection Agency* (EPA), polusi udara didalam ruangan dua hingga lima kali lebih berbahaya daripada luar ruangan. Ditambah lagi dengan pernyataan yang dipublikasikan oleh *World Health Organitation* (WHO), bahwa 2 juta orang didunia meninggal karena polusi udara dan 1,5 juta diantaranya karena polusi udara dalam ruangan (Rezki &Yusfi, 2014). Itu sebabnya tidak hanya diluar ruangan, bahkan didalam ruangan pun polutan dapat menyerang tubuh sebagai radikal bebas.

Dunia kedokteran dan kesehatan telah banyak membahas tentang radikal bebas dan antioksidan. Hal ini dilakukan karena sebagian besar penyekit degeneratif diawali oleh reaksi oksidasi yang berlebihan didalam tubuh. Reaksi oksidasi terjadi setiap saat, ketika kita bernafas pun terjadi reaksi oksidasi. Reaksi ini memicu terbentuknya radikal bebas yang sangat aktif, yang dapat merusak struktur serta fungsi sel. Namun reaktivitas radikal bebas tersebut dapat dihambat oleh sistem antioksidan yang melengkapi sistem kekebalan tubuh.

Stres oksidatif dapat dikurangi dengan pemberian tambahan antioksidan. Antioksidan yang erat berkaitan dengan pencegahan penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskuler, neurologis, kanker dan stres oksidatif disfungsi (Szollosi, 2002). Antioksidan merupakan zat penghambat reaksi oksidasi akibat radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan asam lemak tak jenuh, membran dinding sel, pembuluh darah, basa DNA dan jaringan lipid sehingga dapat menimbulkan penyakit (Widyastuti, 2010).

Antioksidan sintetik saat ini yang tersedia seperti butylated hidroksi anisol (BHA), butylated hidroksi toluena (BHT), hydroquinon tersier terbutilasi dan ester asam galat, diduga menyebabkan efek negatif bagi kesehatan. Oleh karena itu, pemakaian berlebihan dari senyawa tersebut dibatasi dan menggantikan dengan pemakaian antioksidan alami. Selain itu, antioksidan sintetik ini juga menunjukkan kelarutan yang rendah dan aktivitas antioksidan sedang (Barlow, 1990; Branen, 1975).

Saat ini banyak ditemukan dipasaran produk farmasi yang disebut- sebut dapat memberi efek sebagai antioksidan dan dikatakan dapat melawan kerja radikal bebas. Produk – produk antioksidan tersebut dijual dengan harga yang cukup mahal. Padahal, komponen tanaman yang mengandung antioksidan terdapat di alam secara melimpah, baik dalam buah-buahan, sayur-sayuran maupun kacang-kacangan. Oleh karena itu perlunya peningkatan pemanfaatan tanaman obat sebagai antioksidan
untuk mengurangi cedera jaringan akibat radikal bebas. Beberapa antioksidan alami (misalnya kulit buah manggis) sudah dieksploitasi secara komersial baik sebagai antioksidan aditif atau suplemen gizi. Banyak jenis tanaman lainnya telah diteliti untuk mencari antioksidan baru tetapi umumnya masih mencari informasi mengenai potensi antioksidan dari spesies tanaman tertentu.

Aktivitas antioksidan tanaman kemungkinan disebabkan karena kandungan senyawa fenolik, flavonoid dan terpenoid. Flavonoid adalah kelompok senyawa polifenol yang dikenal dengan sifat peredaman terhadap radikal bebas , penghambatan reaksi hidrolitik dan oksidatif oleh enzim dan sebagai anti – inflamasi ( Pourmorad, 2006) . Terpenoid adalah senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemampuan untuk meningkatkan fungsi imunitas tubuh, bereaksi dengan oksigen singlet dan berbagai spesies radikal sehingga membantu mengurangi stress oksidatif dalam tubuh manusia (Grabmann, 2005).

Salah satu tanaman yang umum dikenal dikalangan masyarakat yaitu Jintan hitam (*Nigella* *sativa* L.) yang digunakan sebagai obat yang menyembuhkan segala macam gangguan pernafasan, memperkuat sistem kekebalan tubuh dari serangan virus, kuman dan bakteri, meningkatkan fungsi otak dan mengatasi gangguan tidur dan stres.

Jintan hitam dikenal sebagai obat yang menyembuhkan segala macam penyakit . Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui senyawa apa yang berpotensi sebagai antioksidan.

Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kadar senyawa fenolik, flavonoid dan terpenoid serta mengetahui aktivitas antioksidan dari tanaman Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) yang dilakukan dengan 3 metode yaitu DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) dan CUPRAC (*cupric ion reducing antioxidant capacity*).

**B. Rumusan Masalah**

1. Berapa kadar fenolik, flavonoid dan terpenoid yang terkandung dalam ekstrak metanol jintan hitam (*Nigella sativa* L.)
2. Apakah terdapat perbedaan aktivitas antioksidan pada sampel dengan analisis menggunakan 3 metode ?
3. Berapakah konsentrasi partisi larut heksan dan tidak larut heksan yang dapat berefek sebagai antioksidan ?

**C. Tujuan Penelitian**

1. Menentukan kadar fenolik, flavonoid dan terpenoid yang terkandung dalam ekstrak metanol jintan hitam (*Nigella sativa* L.).
2. Menentukan perbedaan aktivitas antioksidan pada sampel menggunakan 3 metode.
3. Menentukan konsentrasi partisi larut heksan dan tidak larut heksan dari jintan hitam yang dapat berefek sebagai antioksidan.

**D. Manfaat Penelitian**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dijadikan sebagai bukti ilmiah tentang efek antioksidan dari Jintan hitam yang dapat bermanfaat menangkal radikal bebas, sehingga kedepannya dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan pada penelitian berikutnya.

Adapun pemanfaatan dalam masyarakat dimana jintan hitam yang biasanya digunakan sebagai obat herbal untuk penyakitgangguan nafas, memperbaiki fungsi otak, kedepannya dapat dikonsumsi sebagai senyawa antioksidan yang dapat menangkal radikal bebas.

**BAB II**

**TINJAUAN PUSTAKA**

**A. Uraian Tumbuhan**

### Sistematika Tumbuhan (Tjitrosoepomo, 2010)

Kerajaan : Plantae

Divisio : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Bangsa : Ranunculales

Suku : Ranunculaceae

Marga : Nigella

Jenis : *Nigella sativa* L.

Tabel 2.1 Klasifikasi Jintan Hitam

### Penamaan Tanaman Jintan Hitam

Jintan hitam (Indonesia), Black cumin (Inggris), Habbatusauda (Arab) dan Kamaazaruus (Yunani).

### Morfologi

Nigella sativa atau Jintan Hitam Pahit ini merupakan jenis tanaman bunga , tumbuh setinggi 20-50 cm , berbatang tegak, berkayu dan berbentuk bulat menusuk.

Daun runcing ,bercabang, bergaris (namun garis daunnya tidak seperti benang ; tidak seperti ciri daun tumbuhan genus Nigella pada umumnya), daunnya kadang-kadang tunggal atau bisa juga majemuk dengan posisi tersebar atau berhadapan. Bentuk daunnya bulat telur berujung lancip. Di bagian permukaan daunnya terdapat bulu halus. Tumbuhan jintan hitam memiliki bunga yang bentuknya beraturan. Bunga ini kemudian menjadi buah berbentuk bumbung atau buah kurung berbentuk bulat panjang. Bunganya menarik dengan warna biru pucat atau putih, dengan 5-10 mahkota bunga.  Buahnya keras seperti buah buni. Berbentuk besar, menggembung, berisi 3-7 unit folikel, masing-masing berisi banyak biji atau benih yang sering digunakan manusia sebagai rempah-rempah. Memiliki rasa pahit yang tajam dan bau seperti buah strawberry. Digunakan terutama pada permen dan minuman keras. Bijinya berwarna hitam pekat (Vosen, 2001: 51-52).

**B. Uraian Umum Antioksidan dan Radikal Bebas**

### Antioksidan

Antioksidan didefinisikan sebagai inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk senyawa non-radikal bebas yang tidak reaktif dan relatif stabil. Sementara itu, radikal bebas adalah suatu senyawa atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luarnya. Berbagai kemungkinan dapat terjadi sebagai akibat kerja radikal bebas, termasuk gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker (Winarsi, 2007: 2).

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas sehingga dapat melindungi sistem biologi tubuh dari efek merugikan yang timbul dari proses atau pun reaksi yang menyebabkan oksidasi yang berlebihan (Hariyatimi, 2004: 54).

### Radikal Bebas

Radikal bebas adalah molekul yang sangat reaktif karena memiliki elektron yang tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga dapat bereaksi 3 dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron molekul sel tersebut (Utomo, Suprijono, & Risdianto, 2011: 3).

Dari sudut pandang kedokteran, hanya dua radikal bebas yang menarik perhatian radikal hidroksil (-OH) dan radikal superoksida yang terdiri atas ikatan dua atom oksigen (O2) dengan satu elektron yang tidak berpasangan (Youngson, 2005: 15).

Radikal bebas oksigen ini, yang masing-masing memiliki satu elektron tunggal, bisa menyerang dan merusak nyaris setiap molekul yang ada didalam tubuh. Radikal tersebut juga sangat aktif sehingga begitu terbentuk, hanya sepersekian detik kemudian radikal ini telah menggabungkan diri dengan yang lain. Dalam penggabungan tersebut, radikal mungkin melepas elektron tunggalnya atau menangkap satu elektron dari molekul lain untuk membentuk pasangan. Melalui kedua peristiwa ini, radikal menjadi stabil tetapi sekarang molekul yang terserang hanya mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan dan dengan demikian beralih menjadi sebuah radikal lain. Kita bisa melihat bahwa ini adalah resep sempurna untuk dimulainya suatu reaksi berantai yang cepat dan sangat merusak pada jaringan (Youngson, 2005: 15).

**C. Uji Aktivitas Antioksidan**

Pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode di antaranya CUPRAC, DPPH, dan FRAP. Tes kapasitas antioksidan (aktivitas antioksidan) dapat secara luas diklasifikasikan sebagai transfer elektron (TE) dan transfer atom hidrogen (TAH) berdasarkan tes. Sebagian besar tes TAH berbasis kinetika, dan melibatkan skema reaksi kompetitif di mana antioksidan dan substrat bersaing untuk radikal *peroxyl thermally* dihasilkan melalui dekomposisi dari senyawa azo. Tes TE berdasarkan mengukur kapasitas antioksidan dalam pengurangan oksidan, yang berubah warna ketika berkurang. Tes TE mencakup ABTS/TEAC, CUPRAC, DPPH, Folin-Ciocalteu dan FRAP metode, masing-masing menggunakan reagen redoks khromogenik dengan potensi standar yang berbeda (Apak, Guclu, & Demirata, 2007: 1496).

**D. Kerangka Konsep**

Radikal Bebas

Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.)

Antioksidan (Fenol, Flavonoid, Karotenoid)

Penyakit akibat stress oksidatif

**E. Hipotesis**

Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) mengandung senyawa metabolit sekunder Fenol, Flavonoid dan Terpenoid yang berefek sebagai antioksidan. Semakin tinggi konsentrasi kandungan senyawa fenol, flavonoid dan terpenoid, maka semakin besar pula aktivitas antioksidannya.

**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

## A. Jenis dan Lokasi Penelitian

### 1. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian kuantitatif.

### 2. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi dan Laboratorium Kimia Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar. Dimulai pada tanggal 28 April 2014.

## B. Pendekatan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimen laboratorium

**C. Sampel Penelitian**

Jintan hitam (*Nigella sativa* L.) diperoleh dari Arab Saudi.

**C. Instrumentasi Penelitian**

**1. Alat**

 Alat-alat yang digunkan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, blender, cawan porselin, centrifuge, corong, corong pisah, erlenmeyer, eksikator, gelas kimia, gelas ukur, gelas piala, kaca arloji, kain putih, karet gelang, labu tentukur, mikro pipit, neraca anlaitik, oven, pipet volume, rotavapor, sendok tanduk, spatula, spektrofotometri UV-Vis, tabung centrifuge, toples, vial dan wadah (mangkok).

### 2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah simplisia Jintan hitam; akuades; AlCl3; buffer asetat 300 mM pH 3,6; buffer amonium asetat pH 7; CuCl2·2H2O; DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*); etanol; FeCl3·6H2O; FRAP; HCl metanol; neokuproin etanolik; TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-s-triazine*); troloks*®*; etanol; heksan; kertas saring dan kertas perkamen.

## E. Pengolahan dan Analisis Data

### Pengolahan Sampel

Sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan kemudian diserbukkan. 500 g serbuk sampel Jintan hitam dimaserasi dengan etanol 70% (72 jam). Pelarut diuapkan dengan menggunakan rotavapor.

### Penentuan Kadar Fenol Total

Kadar fenol total ditentukan dengan reagen Folin Ciocalteu (McDonald et al., 2001). Dibuat larutan asam galat dengan konsetrasi 150 µg/ml (larutan stok). Larutan stok kemudian diencerkan sehingga diperoleh larutan pembanding asam galat dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, 150 µg/ml.

Sampel uji dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Sebanyak 0,5 ml larutan asam galat pembanding dengan 5 ml pereaksi Folin Ciocalteu dan 4 ml natrium karbonat 1M. Campuran dibiarkan selama 15 menit, kemudian absorbansi diukur pada panjang gelombang 765 nm. Masing-masing sampel uji diukur tiga kali. Setelah diperoleh absorbansi dari masing-masing larutan pembanding, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear.

### Penentuan Kadar Flavonoid Total

Kadar flavonoid total ditentukan dengan metode kolorimetri aluminium klorida (Chang et al,, 2002). Sebanyak 10 mg kuarsetin (pembanding) ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan stok. Kemudian dibuat pengenceran kuarsetin dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, µg/ml sebagai larutan kuarsetin pembanding. Sebanyak 0,5 ml larutan pembanding diencerkan dengan 1,5 ml metanol kemudian ditambahkan 0,1 ml aluminium (III) klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M dan 2,8 ml aquadest. Setelah diinkubasi 30 menit, absorbansi dari larutan pembanding diukur dengan spektrofotometer UV-sinar tampak pada pangjang gelombang 415 nm. Masing-masing larutan pembanding diukur tiga kali. Setelah diperoleh absorbansi dari masing-masing larutan pembanding, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh persamaan regresi linear.

### Penentuan Kadar Karotenoid Total

Beta karoten (pembanding) di timbang dan dilarutkan dalam n-heksana untuk mendapatkan konsentrasi 100 µg/ml (larutan stok). Larutan stok kemudian diencerkan sehingga diperoleh larutan pembanding beta karoten dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25, µg/ml.

Sampel uji dilarutkan dalam n-heksan sebanyak 2 ml larutan pembanding. sampel uji diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 470 nm. Karoten total dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear dari kurva kalibrasi beta karoten yang telah diukur.

### Partisi Sampel

Pada proses partisi atau pemisahan sampel, dilakukan partisi cair-padat.

### Uji Aktivitas Antioksidan

**a). DPPH**

Pengujian dilakukan dengan mencampur 1,0 ml DPPH 0,343 mM dengan etanol sampai volumenya 5,0 ml dalam labu terukur, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis hingga diperoleh panjang gelombang maksimum.

**b). CUPRAC**

Pengujian dilakukan dengan mencampur 1,0 ml larutan CUPRAC yang diperoleh dari larutan stok, dengan etanol sampai volumenya 5,0 ml dalam labu terukur, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis hingga diperoleh panjang gelombang maksimum.

**c). FRAP**

Pengujian dilakukan dengan mencampur 1,0 ml larutan FRAP dari larutan stok dengan etanol sampai volumenya 5,0 ml dalam labu terukur, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang 400-800 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis hingga diperoleh panjang gelombang maksimum.

### F. Analisis Data

Persamaan regresi linear yang diperoleh dalam bentuk persamaan: y = b(x) + a, digunakan untuk mencari nilai IC50 (*inhibitor concentration 50%*) masing-masing sampel, dengan menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x sebagai IC50. Nilai IC50 menyatakan konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi DPPH sebesar 50%.

Besarnya persentase pengikatan radikal bebas dihitung dengan rumus :

$\% Penghambatan=\frac{absorban blanko-absorban sampel}{Absorban Blanko}x 100\%$

**DAFTAR PUSTAKA**

Apak, R., Guclu, K., & Demirata, B. *Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay*. Molecules , 1496-1547. 2007. (Diakses 26 Januari 2014).

Barlow SM, Toxicological Aspect of Antioxidant Used as Food Additives, in Food Antioxidant, Hudson BJF. Elsevier, London, 1990. pp 253-307

Benzie, I. F., & Strain, J. J. *The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay*. Analytical Biochemistry 70-76. (1996). (Diakses 26 Januari 2014)

Branen AL, Toxicology and Biochemistry of Butilated Hydroxyanisol and Butylated Hydroxytoluene. American Oil Chemists Society, 1975. 5:59-63

Grabmann, J, 2005, Terpenoid as Antioxidant, *Vitamin and Hormon*, Vol 72.

Irawan,R.B.” Rancang Bangun Catalytic Converter Material Substrat Tembaga Berlapis Mangan Untuk Mereduksi Emisi Gas Karbon Monoksida Motor bensin” Laporan Hasil Penelitian.Semarang:LPPM UNIMUS.2012.

Khopkar, S. M. *Konsep Dasar Analitik Kimia*. Jakarta: UI Press. 2003.

Kuncahyo, I., & Sunardi. “Uji Aktivitas Antioksida Ekstrak Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) Terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH)”. *Seminar Nasional Teknologi*. Yogyakarta. 2007

Lenny, S. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida dan Alkaloida. Sumut*: USU Respository. 2006. http://library.usu.ac.id/download/fmipa/06003488.pdfsenyawa. (Diakses 10 Desember 2013)

 Machewad, G. *Studies on Extraction of Safflower Pigments and its Utilization in Ice Cream. Food Processing & Technology.* vol. 3 Research Artikel. 2012. (Diakses 10 Desember 2013).

Prakash, A., Rieglhof, F., & A, M. *Analytical Progress Antioxidant Activity*. Medallion Laboratories 2001. <http://www.medallionlabs.com> (Diakses 20 Januari 2014)

Pourmorad, F, Hosseinimehr, S.J, and Shahabimajd, N, 2006, Antioxidant Activity, Phenol, and Flavonoid Contents of Some Iranian Medicinal Plants, *African Journal of Biotechnology*, Vol.5(11) hal: 1142-1145.

Rezki,N., & Yusfi,M.”Rancang Bangun Prototipe Pengurangan Bahaya Gas Polutan dalam Ruangan dengan metode Elektrolisis berbasis Mikrokontroler”Teknik Elektro.Politeknik Negri Padang.Jurnal (diakses 30 januari 2014)

Szollosi, R. *Total Antioxidant Power in Some Species of Labiatae* (*Adaptation of FRAP Method*) vol 46. 2002. Proceedings of the 7th Hungarian Congress on Plant Physiology. <http://www.sci.u-szeged.hu/ABS> (Diakses 26 Januari 2014)

Vosen, Van. der. *Plant Resources of South-East Asia*: Vegetables oils. Ed Plant Resources of Tropical Africa 14. Wageninge, Netherlands: 2007.

Widyastuti, Niken. “Pengukuran Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC, DPPH dan FRAP serta Kolerasinya dengan Fenol dan Flavanoid pada Enam Tanaman”. *Skripsi.* Bogor: Fakultas Matimatika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB. 2010.

Wijaya, A. “Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan”. *Forum Diagnostic*. Prodia Diagnostic Education Service. 1996.

Youngson, D. R. *Antioksidan: Manfaat Vitamin C & E Bagi Kesehatan*. Penyunt. L. Juwono. Jakarta, Indonesia: Arcan. 2005.