

**PENGARUH SUHU TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DALAM DAUN
ZAITUN (*Olea europaea* L.) DENGAN METODE DPPH**

**Effect of Temperature on Antioxidant Activity in Olive Leaf (*Olea europaea* L.) using
DPPH Method**

Ulfi Abdul Rahman Oey^{1*)}, Tintrim Rahayu^{2*)}, Gatra Ervi Jayanti^{3*)}

¹²³ Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Malang, Indonesia

ABSTRAK

Penyebab penyakit degeneratif disebabkan karena aktivitas dan pola hidup yang kurang sehat. Pola hidup kurang sehat yang pada akhirnya memicu radikal bebas. Radikal bebas adalah molekul yang tidak teroksidasi yang menyebabkan terbentuk molekul baru yang dapat merusak sel tubuh. Radikal bebas dapat diatasi dengan pemberian antioksidan salah satunya dari tumbuhan zaitun (*Olea europaea* L.). Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perlakuan suhu terhadap aktivitas antioksidan pada daun zaitun berdasarkan umur daun melalui perhitungan nilai IC₅₀. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode DPPH. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan suhu 31.6°C pada daun muda menurut perhitungan IC₅₀ dikategorikan sebagai antioksidan kuat karena memberikan nilai hasil perhitungan IC₅₀ sebesar 82.778 ppm dan 165.093 ppm pada daun tua dan tergolong antioksidan sedang, sementara pada perlakuan suhu 44°C memberikan pengaruh lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan suhu 31.6°C dengan nilai IC₅₀ sebesar 123.78 ppm untuk daun muda dan 165.170 ppm untuk daun tua dan tergolong antioksidan sedang sesuai teori bahwa senyawa yang memiliki nilai aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC₅₀ bernilai antara 50 sampai 100, antioksidan sedang apabila jika nilai IC₅₀ bernilai 100-250 ppm, lemah jika nilai IC₅₀ bernilai 250-500 ppm dan tidak aktif jika nilai IC₅₀ bernilai lebih dari 500 ppm, begitupun sebaliknya terkait pemilihan umur daun juga berpengaruh terhadap tinggi rendahnya aktivitas antioksidan dilihat dari perbandingan hasil dari kedua perlakuan bahwa daun muda memiliki tingkat aktivitas antioksidan lebih tinggi dibandingkan dengan daun tua dalam menangkal radikal bebas.

Kata Kunci : Suhu, Antioksidan, Zaitun (*Olea europaea* L.), DPPH.

ABSTRACT

Causes of degenerative diseases are caused by activities and unhealthy lifestyle. unhealthy lifestyle which in turn triggers free radicals. free radicals are molecules that are not oxidized which cause the formation of new molecules that can damage body cells. free radicals can be overcome by giving natural antioxidants, one of which is from the olive plant (*Olea europaea* L.). The purpose of this study was to determine the effect of temperature treatment on antioxidant activity in olive leaves based on leaf age by calculating the IC₅₀ value. The method used in this research is the DPPH method. Based on the results of the study, it can be concluded that the temperature of 31.6°C in young leaves according to calculations is categorized as a strong antioxidant because it provides a calculated value of 82.778 ppm and 165.093 ppm on old leaves and classified as moderate antioxidants, while temperature of 44°C give dominant level under 31.6°C with IC₅₀ values 123.78 ppm for young leaves and 165.170 ppm for old leaves and classified as moderate antioxidants according to the theory that compounds that have very strong antioxidant activity values IC₅₀ values are less than 50 ppm, strong if the IC₅₀ are between 50 and 100, moderate antioxidant if the IC₅₀ values are feasible 100-250 ppm, weak if the IC₅₀ value is 250-500 ppm and inactive if the IC₅₀ value is more than 500 ppm. and vice versa related to the selection of leaf age also affects the level of antioxidant activity seen from the comparison of results from the two treatments that young leaves have a higher level of antioxidant activity than old leaves in counteracting free radicals.

Keywords : Temperature, Antioxidant, Olive (*Olea europaea* L.), DPPH.

*) Ulfi Abdul Rahman Oey, Program Studi Biologi FMIPA UNISMA, Jl. M.T Haryono 193, Malang 65144, telp/E-mail : ulfiabdul@gmail.com

**) Ir. Tintrim Rahayu, M.Si, Program Studi Biologi FMIPA UNISMA, Jl. MT Haryono 193, Malang 65144, telp/E-mail : tintrim.rahayu@unisma.ac.id

Pendahuluan

Radikal bebas diperoleh dari reaksi oksidasi yang hasilnya dapat membentuk rantai panjang dan efek negatifnya dapat menyebabkan kerusakan sel dalam tubuh. Kerusakan sel dalam tubuh inilah yang memicu penyakit-penyakit degeneratif. Alternatif yang dapat dilakukan untuk mengurangi efek negatif radikal bebas adalah dengan mengonsumsi makanan atau minuman yang mengandung antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang bertugas menetralkan radikal bebas. Dalam banyak penelitian, menjelaskan bahwa zaitun (*Olea europaea* L.) mengandung banyak senyawa-senyawa antioksidan yang berfungsi untuk meredakan radikal bebas. Ada banyak manfaat kesehatan yang bisa didapatkan dari pengolahan zaitun terlebih pada buah dan daunnya. Suhu merupakan salah satu faktor yang perlu dipertimbangkan dalam pembuatan obat-obatan alami. Pengolahan yang tidak mempertimbangkan kondisi suhu akan meningkatkan oksidasi dan degradasi senyawa enzimatis sehingga akan berpengaruh terhadap kandungan total aktivitas antioksidan didalamnya. Aktivitas antioksidan pada sampel dapat ditentukan menggunakan metode DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil). Caranya yaitu melalui mekanisme donasi atom hidrogen dari senyawa yang mengandung antioksidan pada radikal DPPH yang ditandai dengan peluruhan warna DPPH dari ungu menjadi kuning (Hanani dkk, 2005) [4]. Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh perlakuan suhu terhadap aktivitas antioksidan dalam daun zaitun disertai umur daun dengan menggunakan perhitungan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ sendiri merupakan salah satu parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari pengujian DPPH. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Penelitian ini bermaksud agar pembaca dapat mengetahui perlakuan suhu disertai umur daun yang baiknya digunakan dalam pembuatan obat-obatan alami khususnya daun zaitun agar dapat dimanfaatkan sebagai obat.

Material dan Metode

Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang di gunakan dalam penelitian ini adalah : Daun zaitun (*Olea europaea* L.) daun muda dan daun tua, aquades, Vitamin C (*Sodium Ascorbyl Phospate*), Etanol dan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Sigma Aldrich Catalog D9132.

Alat- alat yang di gunakan dalam penelitian ini adalah : timbangan analitik Ohaus, tabung reaksi, gelas ukur 10 mL, gelas ukur 50 mL, labu ukur 25 mL, labu erlenmeyer 1000 mL, batang pengaduk/spatula, mikropipet, mikrotip, pipet, blender, kertas label, *aluminium foil*, Tabung sentrifuse, ayakan mesh, kuvet, Rak Tabung Reaksi, Rice cooker miyako, spektrofotometer UV-Vis EPHOC2C, freezer GEA, termometer skala, termometer ruang GEA, sentrifugator PLC Series 03, Taiwan dan Inkubator Memmert.

Metode

Pada percobaan ini, dilakukan 2 metode perlakuan pengeringan zaitun yakni perlakuan pengeringan secara alamiah yaitu dengan bantuan sinar matahari dan pengeringan menggunakan rice cooker pemanasan warm. Untuk bagian tanaman zaitun (*Olea europaea* L.) yang digunakan dalam penelitian adalah pada daunnya. Daun diuji berdasarkan umur yakni daun tua dan daun muda. Sebelum dilakukan pengeringan sampel daun zaitun terlebih dahulu dicuci bersih menggunakan air keran kemudian dikering anginkan selama 24 jam.

proses kering angin dimaksudkan untuk mengurangi kadar air pada sampel sebelum kemudian dilakukan pengeringan selama 3 hari. berikut untuk hasil pengukuran suhu pada rice cooker pemanasan warm adalah sebesar 44°C selama kurun waktu 3 hari pemanasan, sementara untuk perlakuan matahari adalah sebesar 34°C di hari pertama dan kedua sementara di hari ke-3 adalah 27°C. Setelah diperoleh hasil pengukuran suhu harian kemudian dihitung rata-rata (*Mean*) dari kedua perlakuan. untuk suhu rata-rata (*Mean*) perlakuan rice cooker warm diperoleh hasil 44°C, sementara untuk perlakuan matahari adalah sebesar 31.6°C.

Preparasi sampel

Simplisia daun zaitun setiap perlakuan baik yang tua maupun muda yang telah selesai di keringkan setelah itu di blender hingga berbentuk serbuk lalu di ayak dengan ayakan mesh. Setelah itu timbang serbuk daun zaitun masing-masing perlakuan sampel berdasarkan konsentrasi larutan induk sampel 1000 ppm yang akan dibuat dengan menimbang masing- masing perlakuan sampel sebanyak 1 gram yang kemudian di larutkan dalam aquades 1000 mL sembari di homogenkan selama 10 menit, Setelah itu larutan sampel diencerkan kembali pada seri konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 ppm dalam volume 10 mL menggunakan rumus pengenceran dengan memipet 1, 2, 3 dan 4 mL dari larutan induk, kemudian aquades dicukupkan hingga tanda batas, Setelah itu masing-masing sampel yang sudah di buat konsentrasinya kemudian di masukkan kedalam alat tube sentrifuse dan di sentrifugasi selama ± 15 menit dengan kecepatan 2800 rpm. Setelah sentrifuse di sediakan tube lainnya untuk di pisah supernatannya, kemudian di masukkan ke lemari pendingin dengan suhu 4°C. Sentrifugasi sampel dilakukan sebanyak 3x ulangan untuk semua perlakuan sampel pada hari yang berbeda.

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH **Pembuatan Larutan DPPH 0.001 mM**

Untuk membuat larutan DPPH 0.001 mM, ditimbang serbuk DPPH sebanyak 2 mg atau 0.002 gram kemudian dilarutkan dalam etanol 50 mL, setelah itu pindahkan ke gelas ukur yang sudah di lapiasi *aluminium foil* sembari dihomogenkan kemudian di inkubasi selama ± 30 menit.

Pembuatan Larutan Blanko DPPH

Untuk membuat blanko sampel maupun pembanding, dipipet sebanyak 2 mL aquades untuk blanko Sampel dan 2 mL etanol untuk blanko pembanding Vitamin C ke dalam tabung reaksi kemudian di lapiasi dengan *aluminium foil* setelah itu dipipet kembali larutan DPPH sebanyak 2 mL (perbandingan 1:1) menggunakan mikropipet, Setelah itu, tutup kembali tutup larutan atas tabung reaksi dengan *aluminium foil* sampai tidak ada bagian yang terkena cahaya, kemudian di inkubasi dengan suhu 37°C pada alat inkubator selama ± 30 menit, Setelah itu di ukur serapannya pada spektrofotometer UV-Vis EPHOC2C pada panjang gelombang 517 nm.

Pengujian Aktivitas antioksidan Larutan Pembanding Vitamin C

Untuk membuat larutan induk Vitamin C 100 ppm, serbuk ditimbang sebanyak 5 mg dan dilarutkan dengan etanol 50 mL sembari di homogenkan selama 10 menit, setelah itu

larutan diencerkan kembali menjadi konsentrasi 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm pada volume 25 mL dengan memipet 0.5, 1, 1.5, 2, dan 2.5 mL dari larutan induk kemudian etanol dicukupkan hingga tanda batas. Untuk menentukan aktivitas antioksidan, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 2 mL menggunakan mikropipet kemudian ditambahkan 2 mL larutan DPPH (perbandingan 1:1), campuran tersebut dihomogenkan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada inkubator dengan suhu 37°C, selanjutnya di ukur serapannya pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Sampel Hasil Sentrifugasi Daun Zaitun

Untuk uji aktivitas antioksidan pada sampel hasil sentrifugasi daun zaitun, dipipet supernatan hasil sentrifugasi dari tube sentrifuse. untuk masing-masing perlakuan sampel baik perlakuan Rice cooker pada pemanasan warm daun muda, Rice cooker pada pemanasan warm daun tua, matahari daun muda dan matahari daun tua dengan konsentrasi yang sama setiap perlakuannya yakni 100, 200, 300 dan 400 ppm dengan takaran jumlah yang sama yaitu 2 mL. di pipet dan masukkan kedalam tabung reaksi, setelah itu lapisi tabung reaksi dengan *aluminium foil*, setelah itu tambahkan larutan DPPH dengan jumlah yang sama yakni 2 mL (perbandingan 1:1), setelah itu tutup kembali bagian atas tabung reaksi menggunakan *aluminium foil* agar tidak terpapar cahaya. Setelah tertutup rapat, campuran dihomogenkan dan di inkubasi pada alat inkubator pada suhu 37°C dengan kurun waktu $\pm$ 30 menit, selanjutnya di ukur serapannya pada spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 517 nm. Pengujian DPPH pada sampel untuk semua perlakuan dilakukan selama 3x pengulangan dihari yang berbeda.

Penentuan Persen Penghambatan (% Inhibisi)

Nilai % Inhibisi didapatkan dari hasil perhitungan A1, A2 dan A3 atau hasil pengukuran absorbansi selama 3 kali ulangan dari kedua perlakuan tersebut baik yang di uji coba pada daun muda maupun pada daun tua. Perhitungan % Inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs.blanko} - \text{Abs.sampel}}{\text{Abs.blanko}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. Blanko = Absorban DPPH

Abs. Sampel = Absorban Sampel Uji

Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ sendiri merupakan salah satu parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari pengujian DPPH, semakin rendah nilai IC₅₀ dari suatu sampel maka kemampuannya sebagai antioksidan semakin besar. Nilai IC₅₀ didapatkan dari penginputan data menggunakan *microsoft excel* untuk mencari persamaan regresi linier. koefisien y adalah nilai IC yang telah ditetapkan yaitu 50, sedangkan koefisien x adalah nilai

IC₅₀ atau konsentrasi dari ekstrak yang akan dicari nilainya. Rumus dari perhitungan ini adalah sebagai berikut :

$$Y = a + bx$$

Keterangan : Y : % hambat (yaitu 50)

X : Nilai IC₅₀

Hasil dan Diskusi

Hasil Preparasi Sampel Daun Zaitun (*Olea europaea* L.)

Berdasarkan hasil perhitungan keseluruhan suhu rata-rata (*Mean*) kedua perlakuan adalah sebesar 44°C dan 31.6°C. hasil rerata (*Mean*) suhu diperoleh dari hasil perhitungan suhu harian kedua perlakuan dari hari ke-1 hingga hari ke-3. Menurut (Azzayanti, 2019) [1] bahwa perlakuan suhu pada pengeringan matahari didasarkan pada kondisi cuaca setiap harinya dikarenakan perlakuan tersebut merupakan perlakuan pengeringan secara alamiah. Proses pengeringan dipengaruhi oleh suhu dan lama pengeringan. suhu yang tinggi dapat mempercepat proses pengambilan kadar air bahan sehingga proses pengeringan berlangsung lebih cepat (Marbun dkk,2020) [6]. Menurut (Hossain dkk, 2010) [5] bahwa rendahnya aktivitas antioksidan pada simplisia segar memiliki korelasi yang sangat kuat dengan kadar air yang masih tinggi sehingga menyebabkan efek dilusi terhadap kandungan total senyawa antioksidan dalam sampel segar, serta karena tingginya kelembaban sampel juga dapat menyebabkan hilangnya senyawa antioksidan melalui proses degradasi enzimatis yang masih tinggi dalam sampel segar sehingga pembuatan simplisia obat-obatan alami perlu mempertimbangkan kondisi suhu pada saat pengolahan. Berikut Hasil pengamatan pengukuran suhu pada semua perlakuan sampel yang dapat dilihat pada gambar 1 di bawah ini :

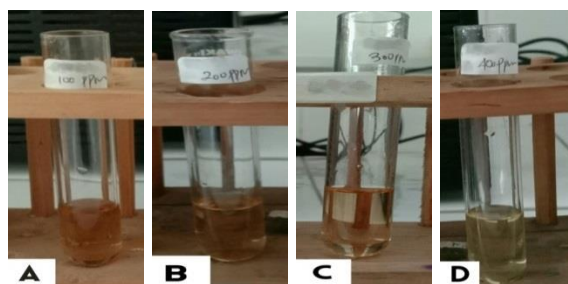


Gambar 1. Hasil Pengamatan Pengukuran Suhu Pada semua Perlakuan Sampel. Ket : (A) = Suhu Pada Daun Muda Warm, (B) = Suhu Daun Tua Warm, (C) = Daun Muda Matahari, (D) = Daun Tua Matahari.

Berdasarkan hasil pengamatan, suhu pada kedua perlakuan ini dikatakan cukup baik karena suhunya tidak terlalu tinggi. Seperti halnya teori yang disampaikan oleh (Tchabo dkk,2018) [14] bahwa perlakuan pengeringan dengan suhu yang tinggi kurang baik karena akan meningkatkan oksidasi dan degradasi senyawa sehingga dapat menurunkan aktivitas antioksidan. Setelah dilakukan pemanasan selama 3 hari, simplisia daun zaitun hasil pemanasan kemudian diblender hingga halus, diayak, kemudian ditimbang untuk dibuat larutan uji berdasarkan konsentrasi yang akan dibuat. Dalam pembuatan preparasi sampel, sampel di ekstraksi dengan menggunakan alat sentrifugator. Sentrifugasi pada sampel dimaksudkan untuk memisahkan organel berdasarkan massa jenisnya melalui proses pengendapan. Larutan akan terbagi menjadi dua fase yaitu supernatant yang berupa cairan dan padatan atau organel yang mengendap. Supernatan pada sampel inilah yang kemudian di ambil untuk diuji aktivitas antioksidannya.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Pada Sampel

Pengujian Aktivitas antioksidan dilakukan dengan melihat perubahan pada warna larutan setelah ditambahkan DPPH. Warna dasar dari larutan DPPH adalah warna ungu, apabila direaksikan dengan larutan yang berisi senyawa yang mengandung antioksidan maka warna larutan dari sampel uji akan merubah warna larutan DPPH sesuai dengan teori yang disampaikan oleh (Molyneux,2004) [8] bahwa Perubahan yang terjadi pada larutan uji disebabkan karena adanya reaksi kimia antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH melalui mekanisme reaksi donasi atau pemberian atom hidrogen oleh senyawa antioksidan ke radikal bebas DPPH yang mengakibatkan adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning atau dari ungu pekat menjadi ungu pudar. Hal ini sesuai dengan hasil yang diamati dari semua perlakuan sampel dengan suhu 44°C dan 31.6°C pada daun muda dan daun tua. Hasil pengamatan warna larutan dari semua perlakuan sampel dapat dilihat pada Gambar 2 bawah ini :



Gambar 2. Hasil Pengamatan Warna Larutan Berdasarkan Konsentrasi Pada Semua Perlakuan Sampel. Ket : (A) = Konsentrasi 100 ppm, (B) = Konsentrasi 200 ppm, (C) = Konsentrasi 300 ppm, (D) = Konsentrasi 400 ppm.

Berdasarkan Gambar 2 pada hasil penelitian ini, warna larutan pada semua perlakuan sampel menunjukkan perubahan warna. Perubahan warna terjadi diikuti dengan kenaikan konsentrasi. Setelah ditambahkan larutan DPPH, Warna larutan pada konsentrasi 100 ppm menunjukkan perubahan warna menjadi orange gelap dengan warna dasar larutan sampel adalah kuning jernih, di ikuti konsentrasi 200 ppm menunjukkan perubahan warna menjadi orange sedang, kemudian konsentrasi 300 ppm menunjukkan perubahan warna menjadi orange cerah, dan yang terakhir pada konsentrasi 400 ppm yang paling memberikan warna lebih cerah mendekati kuning pucat. Menurut (Miranti dkk,2016) [7] bahwa prinsip kerja DPPH ini adalah senyawa antioksidan yang mendonorkan H^+ pada DPPH sehingga mengubah radikal bebas DPPH yang berwarna ungu menjadi senyawa non radikal DPPH yang berwarna kuning. selain dengan mengamati perubahan warna larutan, untuk mengetahui konsentrasi yang lebih berpengaruh dalam menghambat radikal DPPH pada penelitian ini juga dapat dilakukan dengan melihat hasil pengukuran absorbansi atau serapan pada spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm kemudian dihitung % Inhibisinya. Untuk melihat hasil perhitungan % Inhibisi dari semua perlakuan sampel dapat dilihat pada Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 1 hasil perhitungan % Inhibisi dari pengukuran absorbansi dari ulangan 1, 2 dan 3 (A1, A2, dan A3) pada suhu 44°C dan 31.6°C Pada daun muda maupun daun tua dapat dipaparkan bahwa konsentrasi yang menunjukkan aktivitas antioksidan tertinggi dari semua perlakuan sampel adalah pada konsentrasi 400 ppm sesuai dengan hasil perhitungan yang tertera diatas bahwa Kenaikan % Inhibisi sebanding dengan kenaikan konsentrasi larutan uji. % Inhibisi didapat dari selisih absorbansi blanko dengan absorbansi sampel. Semakin besarnya nilai konsentrasi ekstrak sampel, maka nilai absorbansi akan

semakin kecil dan berbanding terbalik dengan nilai inhibisi yang semakin besar (Gayatri,2021) [2].

Tabel 1. Hasil perhitungan % Inhibisi perlakuan suhu 31.6°C dan 44°C pada daun muda dan daun Tua.

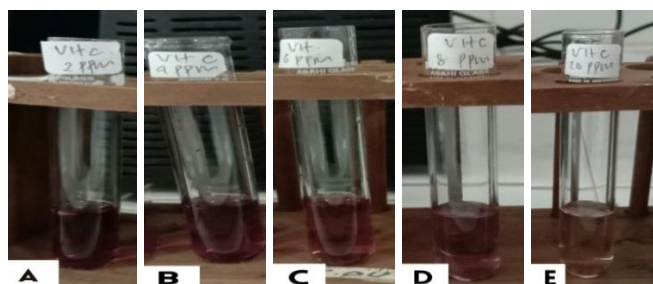
Perlakuan	Suhu <i>(Mean)</i>	Konsentrasi	A1	A2	A3	Rata-Rata	% Inhibisi
		Blanko	0.56	0.65	0.514	0.575	
Warm Daun Muda	44°C	100	0.233	0.323	0.279	0.278	0.516
		200	0.204	0.304	0.25	0.253	0.561
		300	0.188	0.278	0.234	0.233	0.594
		400	0.171	0.261	0.217	0.216	0.624
Warm Daun Tua		100	0.254	0.344	0.3	0.299	0.479
		200	0.239	0.329	0.285	0.284	0.506
		300	0.212	0.322	0.258	0.264	0.541
		400	0.204	0.294	0.25	0.249	0.566
Matahari Daun Muda	31.6°C	100	0.296	0.396	0.342	0.345	0.401
		200	0.274	0.364	0.32	0.319	0.445
		300	0.247	0.297	0.287	0.277	0.518
		400	0.196	0.286	0.242	0.241	0.580
Matahari Daun Tua		100	0.243	0.333	0.289	0.288	0.499
		200	0.222	0.312	0.27	0.268	0.534
		300	0.211	0.301	0.257	0.256	0.554
		400	0.192	0.282	0.238	0.237	0.587

Dari hasil yang tertera diatas sesuai dengan teori yang disampaikan sebelumnya bahwa absorbansi yang paling rendah nilainya menghasilkan nilai % Inhibisi yang tinggi. hasilnya dapat dilihat pada konsentrasi 400 ppm dari semua perlakuan sementara % Inhibisi

terendah terlihat pada konsentrasi 100 ppm. Nilainya cenderung meningkat diikuti konsentrasi mulai dari konsentrasi 200 ppm, kembali meningkat pada konsentrasi 300 ppm dan kemudian terjadi peningkatan tertinggi pada konsentrasi 400 ppm. Naiknya % Inhibisi dipengaruhi oleh menurunnya nilai absorbansi DPPH yang dihasilkan oleh sampel. Hal Ini mengakibatkan semakin tinggi konsentrasi sampel, maka semakin kecil nilai absorbansinya, sehingga mengakibatkan % Inhibisi semakin naik (Rakhmanta,2020) [10]. Berdasarkan pemaparan hasil pengamatan perubahan warna larutan sampel dan perhitungan % Inhibisi diatas menunjukkan tingkat kesetaraan yang sama artinya hubungan keduanya berbanding lurus sesuai dengan hasil yang dipaparkan. Perubahan warna larutan diikuti dengan kenaikan konsentrasi larutan begitupun sebaliknya dengan hasil pemaparan perhitungan % Inhibisi. Konsentrasi dengan perubahan warna sangat cerah dan % Inhibisi yang tinggi ditunjukan pada konsentrasi 400 ppm dan konsentrasi yang sedikit memberikan perubahan warna dan % Inhibisi yang paling kecil diantara konsentrasi lainnya adalah pada konsentrasi 100 ppm. perubahan warna larutan dan % Inhibisi pada larutan sampel mengalami kenaikan diikuti dengan kenaikan konsentrasi mulai dari yang paling kecil 100 sampai dengan 400 ppm.

Uji Aktivitas Antioksidan Pada Pembanding Vitamin C

Untuk kontrol positif dalam pengujian ini digunakan Vitamin C. Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena tergolong antioksidan kuat (Syafrida dkk,2018) [12]. dalam pembuatan larutan, pelarut yang digunakan untuk pembanding Vitamin C adalah pelarut Etanol. Etanol digunakan untuk pembanding Vitamin C sebagai pelarut karena sama halnya seperti pelarut aquades yang digunakan untuk sampel yakni sama-sama bersifat polar. seperti halnya yang disampaikan oleh (Gillespie & Paul,2001) [3] bahwa senyawa flavonoid bersifat polar sehingga dibutuhkan pelarut yang memiliki polaritas yang sama. Berikut hasil pengamatan warna larutan Vitamin C yang dapat dilihat pada Gambar 3 dibawah ini :



Gambar 3. Hasil Pengamatan Warna Larutan Berdasarkan Konsentrasi Pada Pembanding Vitamin C. Ket : (A) = Konsentrasi 2 ppm, (B) = Konsentrasi 4 ppm, (C) = Konsentrasi 6 ppm, (D) = Konsentrasi 8 ppm, (E) = Konsentrasi 10 ppm.

Seperti yang terlihat pada Gambar 3 diatas bahwa warna larutan berubah seiring dengan kenaikan konsentrasi. Konsentrasi Vitamin C yang digunakan pada pengujian ini adalah 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Pada gambar yang tertera terlihat bahwa konsentrasi yang memiliki perubahan warna lebih cerah adalah pada konsentrasi 10 ppm dan konsentrasi yang tidak banyak memberikan perubahan warna adalah pada konsentrasi 2 ppm. Pada konsentrasi 2 ppm memberikan warna ungu gelap setelah ditambahkan larutan DPPH dengan warna dasar larutan pembanding vitamin C yaitu putih cerah, kemudian konsentrasi 4 ppm memberikan warna ungu sedikit terang, diikuti konsentrasi 6 ppm memberikan warna ungu sedang, setelah

itu konsentrasi 8 ppm memberikan warna ungu cerah dan konsentrasi yang memberikan warna lebih cerah pada konsentrasi 10 ppm. Perubahan yang terjadi pada larutan pembanding disebabkan karena adanya reaksi kimia antara senyawa antioksidan dan radikal bebas DPPH melalui mekanisme reaksi donasi atau pemberian atom hidrogen oleh senyawa antioksidan ke radikal bebas DPPH yang mengakibatkan adanya perubahan warna larutan dari ungu menjadi kuning atau dari ungu pekat menjadi ungu pudar. Perubahan warna tersebut yang menyebabkan penurunan nilai absorbansi sampel (Molyneux,2004) [8]. Pada hasil pengamatan Gambar 3 perubahan warna pada larutan uji yang sudah ditambahkan DPPH mengalami perubahan warna seiring dengan tingginya konsentrasi larutan yang dibuat. Warna larutan pembanding Vitamin C memudar mulai dari ungu menjadi ungu cerah seiring dengan peningkatan konsentrasi. Ini menunjukkan bahwa semakin tingginya konsentrasi larutan, semakin baik pengaruhnya terhadap aktivitas antioksidan pada larutan uji begitupun sebaliknya. hal ini juga bisa dibuktikan dengan hasil perhitungan % Inhibisi pada pembanding Vitamin C yang tertera pada Tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Hasil perhitungan % Inhibisi pada pembanding Vitamin C.

Pembanding	Konsentrasi	A1	A2	A3	Rata-Rata	% Inhibisi
Vitamin C	Blanko	0.85	0.861	0.815	0.842	
	2	0.655	0.666	0.62	0.647	0.232
	4	0.619	0.62	0.569	0.603	0.284
	6	0.541	0.552	0.506	0.533	0.367
	8	0.449	0.468	0.424	0.447	0.469
	10	0.4	0.411	0.365	0.392	0.534

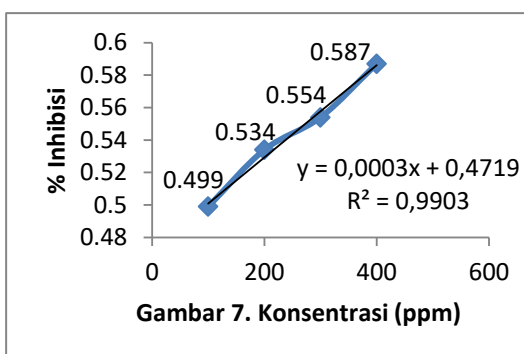
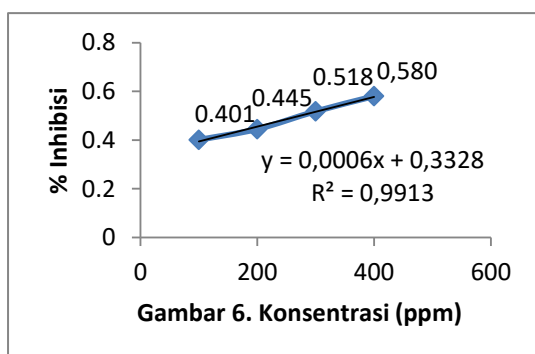
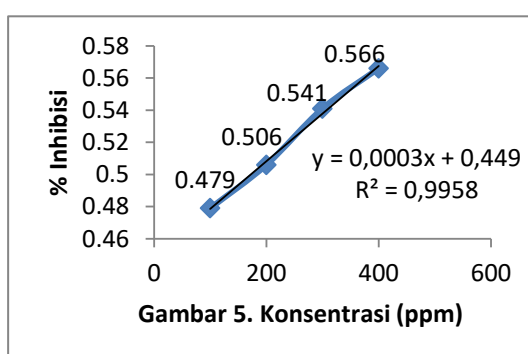
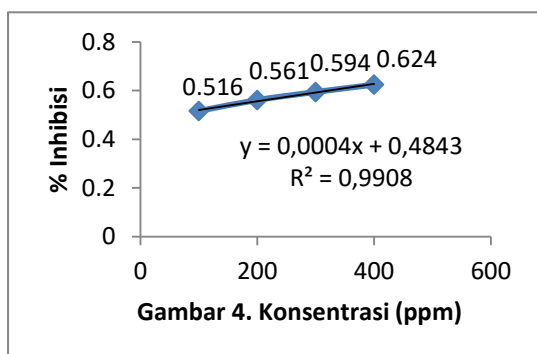
Berdasarkan Tabel 2 hasil pengukuran % Inhibisi dari pembanding Vitamin C ulangan 1,2 dan 3 (A1, A2 dan A3) dapat dilihat bahwa nilai % Inhibisi pada konsentrasi 10 ppm menunjukan nilai % Inhibisi yang lebih tinggi dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Nilai % Inhibisi terendah pada pembanding vitamin C adalah pada konsentrasi 2 ppm. Nilai % Inhibisi mengalami peningkatan nilai didasarkan pada kenaikan konsentrasi. Sesuai dengan hasil yang tertera pada tabel nilai % Inhibisi semakin meningkat sesuai dengan konsentrasi yang dibuat yaitu 2, 4, 6, 8 dan 10 ppm. Konsentrasi 10 ppm adalah konsentrasi yang memberikan pengaruh maksimum terhadap aktivitas antioksidan pada pembanding vitamin C dan konsentrasi 2 ppm adalah konsentrasi yang memberikan pengaruh minimum terhadap aktivitas antioksidan pada pembanding vitamin C.

Berdasarkan pemaparan hasil pengamatan perubahan warna larutan pembanding dan perhitungan % Inhibisi diatas menunjukan tingkat kesetaraan yang sama artinya hubungan keduanya berbanding lurus sesuai dengan hasil yang dipaparkan. Perubahan warna larutan diikuti dengan kenaikan konsentrasi larutan begitupun sebaliknya dengan hasil pemaparan perhitungan % Inhibisi. Konsentrasi dengan perubahan warna sangat cerah dan % Inhibisi

yang tinggi ditunjukkan pada konsentrasi 10 ppm dan konsentrasi yang sedikit memberikan perubahan warna dan % Inhibisi yang paling kecil diantara konsentrasi lainnya adalah pada konsentrasi 2 ppm. Perubahan warna larutan dan % Inhibisi pada larutan sampel mengalami kenaikan diikuti dengan kenaikan konsentrasi mulai dari yang paling kecil 2 sampai dengan 10 ppm.

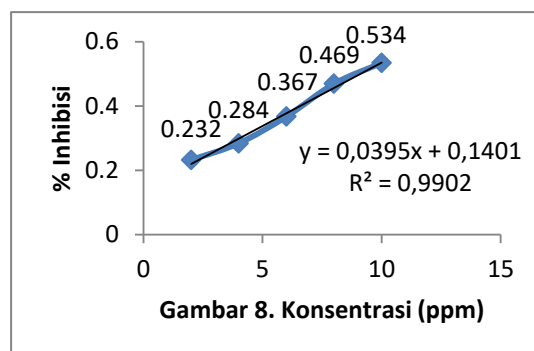
Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dalam pengujian ini dapat ditetapkan dengan menggunakan persamaan regresi linier. Penginputan data menggunakan *microsoft excel* untuk mencari persamaan regresi linier. Nilai IC₅₀ didapatkan dari persamaan regresi linier $y = a + bx$, dimana koefisien y adalah nilai IC yang telah ditetapkan yaitu 50, sedangkan koefisien x adalah nilai IC₅₀ atau konsentrasi dari ekstrak yang akan dicari nilainya. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Hubungan konsentrasi dan % Inhibisi dalam Pengujian ini adalah % Inhibisi adalah kemampuan suatu bahan untuk menghambat aktivitas radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi suatu sampel. Sedangkan nilai IC₅₀ sendiri merupakan salah satu parameter yang biasa digunakan untuk menginterpretasikan hasil dari pengujian DPPH, semakin rendah nilai IC₅₀ dari suatu sampel maka kemampuannya sebagai antioksidan semakin besar (Syarif dkk,2016) [13]. Berikut hasil pemaparan penentuan nilai IC₅₀ hubungan konsentrasi dan % Inhibisi dari semua perlakuan sampel yang dapat dilihat pada Gambar 4, 5, 6, dan 7 dibawah ini :



Gambar 4, 5, 6, 7. Hasil pemaparan penentuan nilai IC₅₀ Hubungan konsentrasi dan % Inhibisi dari semua perlakuan sampel. Ket : Gambar 4. Perlakuan Suhu 44°C Pada Daun Muda, Gambar 5. Perlakuan Suhu 44°C Pada Daun Tua, Gambar 6. Perlakuan Suhu 31.6°C Pada Daun Muda, Gambar 7. Perlakuan Suhu 31.6°C Pada Daun Tua.

Berdasarkan Gambar 4, 5, 6 dan 7 hubungan konsentrasi dan % inhibisi pada suhu 31.6°C dan 44°C yang diperoleh dari persamaan Regresi Linear di atas dapat dipaparkan bahwa nilai hasil penginputan data dari perhitungan ini adalah $y = 0.0004x + 0.4843$ untuk suhu 44°C pada daun muda dengan Nilai $R^2 = 0.9908$ dan $y = 0.0003x + 0.449$ untuk daun tua dengan nilai $R^2 = 0.9958$ sementara untuk suhu 31.6°C daun muda adalah $y = 0.0006x + 0.3328$ dengan nilai $R^2 = 0.9913$ dan daun tua adalah $y = 0.0003x + 0.4719$ dengan nilai $R^2 = 0.9903$. berdasarkan nilai R^2 yang didapat dari perhitungan persamaan Regresi linear tersebut menunjukkan korelasi yang baik antara konsentrasi sampel dengan % Inhibisi karena nilainya mendekati +1 (bernilai positif). Selanjutnya untuk hasil perhitungan nilai IC_{50} diperoleh hasil 123.78 ppm untuk suhu 44°C pada daun muda dan 165.170 ppm untuk daun tua, Sementara untuk suhu 31.6°C daun muda diperoleh hasil hasil 82.778 ppm dan 165.093 ppm untuk daun tua. jika dibandingkan diantara keduanya, perlakuan suhu 31.6°C memberikan pengaruh lebih besar dibandingkan dengan suhu 44°C. Dilihat dari hasil perhitungan nilai IC_{50} , Nilai yang tertera menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan paling tinggi adalah pada suhu 31.6°C karena menunjukkan nilai IC_{50} lebih kecil dibandingkan dengan suhu 44°C sesuai teori yang disampaikan oleh (Syarif dkk,2016) [13] bahwa semakin kecil nilai IC_{50} , maka semakin besar aktivitas antioksidan pada sampel. Begitupula untuk hasil uji umur daun diantara keduanya bahwa yang memberikan hasil paling baik adalah pada daun muda. Sesuai dengan teori yang disampaikan oleh (Prayitno & Nuryandani,2011) [9] bahwa daun muda umumnya memiliki kandungan vitamin dan enzim yang tinggi karena diperlukan dalam proses pertumbuhan, perkembangan dan pembelahan sel-sel daun tersebut. Pada perkembangannya konsentrasi metabolit sekunder tanaman akan berangsur menurun seiring penurunan aktivitas perkembangan daun tersebut. sehingga dapat dikatakan umur daun terutama daun muda zaitun memberikan pengaruh terhadap aktivitas antioksidan dibandingkan daun tua. Selanjutnya untuk melihat hasil pemaparan penentuan nilai IC_{50} Hubungan konsentrasi dan % Inhibisi pada pembanding vitamin C dapat dilihat pada Gambar 8 dibawah ini :



Gambar 8. Hasil pemaparan penentuan nilai IC_{50} Hubungan konsentrasi dan % Inhibisi Pembanding Vitamin C.

Berdasarkan Gambar 8 hasil penginputan data pada *Microsoft excel* dapat dipaparkan bahwa sama halnya dengan hasil pada perlakuan sampel yang memaparkan Nilai R^2 yang mendekati +1 adalah (bernilai positif) karena menunjukkan korelasi yang baik antara konsentrasi dengan % Inhibisi. Pada hasil yang tertera pada gambar perhitungan persamaan regresi linear pada pembanding Vitamin C juga menunjukkan hasil yang sama nilainya mendekati +1 yaitu 0.9902, sementara hasil penginputan data untuk mencari nilai x dan y diperoleh hasil yang sudah tertera pada kurva adalah $y = 0.0395x + 0.1401$. Berdasarkan hasil perhitungan untuk mendapatkan nilai IC_{50} menggunakan rumus $y=a+bx$ pada vitamin C

sesuai dengan hasil yang sudah tertera diatas diperoleh Nilai IC_{50} pada Pembanding Vitamin C adalah sebesar 1.262 ppm. Nilai hasil perhitungan ppm yang lumayan kecil dibandingkan hasil perhitungan pada kedua perlakuan sampel yang nilainya cukup besar sesuai dengan yang di sampaikan oleh (Syarif dkk,2016) [13] bahwa Semakin Kecil nilai IC_{50} maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Menurut (Susanti dkk, 2020) [11] bahwa senyawa yang memiliki nilai aktivitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} bernilai antara 50 sampai 100, antioksidan sedang apabila jika nilai IC_{50} bernilai 100-250 ppm, lemah jika nilai IC_{50} bernilai 250-500 ppm dan tidak aktif jika nilai IC_{50} bernilai lebih dari 500 ppm. Dari teori ini dapat dikatakan bahwa Vitamin C jika dibandingkan dengan sampel maka vitamin C tergolong antioksidan sangat kuat karena nilainya dibawah 50 ppm, sementara sampel khususnya pada perlakuan daun muda dengan suhu $31.6^{\circ}C$ tergolong antioksidan kuat karena nilainya dibawah 100 ppm, sementara pada daun tua tergolong antioksidan sedang karena nilainya di atas 100 ppm, sedangkan pada suhu $44^{\circ}C$ pada daun muda dan daun tua tergolong dalam antioksidan sedang karena nilainya di atas 100 ppm.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa perlakuan suhu $31.6^{\circ}C$ memberikan pengaruh dominan terhadap aktivitas antioksidan dibandingkan dengan perlakuan suhu $44^{\circ}C$ dilihat dari perbandingan nilai IC_{50} dari kedua perlakuan sampel, serta umur yang berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan adalah pada daun muda dilihat dari hasil perhitungan nilai IC_{50} . pada perlakuan suhu $31.6^{\circ}C$ nilai IC_{50} setelah perhitungan adalah sebesar 82.778 ppm untuk daun muda dan tergolong antioksidan kuat, serta 165.093 untuk daun tua dan tergolong antioksidan sedang, sementara untuk perlakuan suhu $44^{\circ}C$ sebesar 123.78 ppm pada daun muda dan 165.170 ppm pada daun tua dan tergolong antioksidan sedang. Dari hasil perbandingan suhu maupun umur daun dari kedua perlakuan sampel menunjukan bahwa suhu $31.6^{\circ}C$ dan umur daun terutama daun muda memiliki tingkat aktivitas antioksidan lebih tinggi karena nilai IC_{50} yang dihasilkan lebih rendah sesuai prinsip dasar nilai IC_{50} bahwa semakin kecil nilai IC_{50} yang dihasilkan maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya dalam menangkal radikal bebas.

Daftar Pustaka

- [1] Azzayanti, A. S. 2019. Pengaruh Variasi Suhu Pengeringan Terhadap Aktivitas Antioksidan Teh Daun Kumis Kucing (*Orthosiphon spicatus* B.B.S.). Prodi Biologi. FKIP. Universitas Sanata Dharma.
- [2] Gayatri, W. N. 2021. Perbandingan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) dan Ekstrak Etanol Biji Mahoni (*Swietenia Macrophylla king*) Menggunakan Metode DPPH. Fakultas MIPA. Universitas Islam Indonesia. Yogyakarta.
- [3] Gillespie, R. J., Paul. L. A .2001. Chemical Bonding and Molecular Geometry. Oxford University Press, London.
- [4] Hanani, E ., A. M., dan R. S. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam *Spons Callyspongia SP* dari Kepulauan Seribu. Departemen Farmasi. FMIPA UI. 2, Vol.3. p 130.

- [5] Hossain, M. B., B. C., M. A. B., B. N .2010. Effect of drying antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. Food Chemistry. 123 (1) : 85-91.
- [6] Marbun, R. R. M., Sholahuddin., R. T .2020. Pengaruh Kombinasi Suhu dan Dehumidifikasi Udara Pengering Terhadap Aktivitas Antioksidan Irisan Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*). Fakultas Pertanian. Universitas Tanjungpura.
- [7] Miranti, M., W. S., F.A .2016. Aktivitas Antioksidan Minuman Jeli Sari Buah Pepaya California (*Carica papaya L.*). Prodi Farmasi. FMIPA. Universitas Pakuan.
- [8] Molyneux, P. 2004. The Use of the stable *free radical diphenyl picrylhydrazyl* (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal Science of Technology. 26 (2) : 211-219.
- [9] Prayitno, E., E. Nuryandani .2011. Optimalisasi Ekstrak DNA Jarak Pagar (*Jatropha Curcas*) Melalui Pemilihan Daun yang Sesuai. Nusantara Bioscience. 3 : 1-6.
- [10] Rakhmanta, P. S .2020. Kajian Pengaruh Variasi Pelarut Pengekstraksi Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) Terhadap Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Ngudi Waluyo Ungaran.
- [11] Susanti, Y., A. V. P., D. R. 2020. Nilai Antioksidan dan SPF dari Kombinasi Minyak Biji Wijen (*Seasamum Indicum L.*) dan Minyak Biji Bunga Matahari (*Helianthus annuus L.*). Majalah Farmaseutik. 16 (1) : 107-110.
- [12] Syafrida, M., S. D., M. I. 2018. Pengaruh Suhu Pengeringan Terhadap Kadar Air, Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun dan Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus L.*), Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro., Vol 20. No 1. Hal. 44-50.
- [13] Syarif, R. A., M., A. R. A., A. M. 2016. Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan dengan Menggunakan Metode Peredaman Radikal DPPH Ekstrak Etanol Daun *Cordia myxa L.* Universitas Muslim Indonesia. Makassar. Vol 2 No 1.
- [14] Tchabo, W., Y. M., E. K., L. X., M. W., M. T. A. 2018. Impact of Extraction Parameters and Their Optimization on The Nutraceuticals and Antioxidant Properties of Aqueous Extract Mulberry leaf. International Journal of Food Properties, 21 (1), 717-732.