

## 4. PENGARUH KEBERADAAN NaCl TERHADAP PENGUJIAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN

### 4.1. METODE DPPH (2,2 difenil-1-pikrilhidrazil)

Berdasarkan Tabel 2., dapat dilihat bahwa pengukuran sampel dengan metode DPPH umumnya menggunakan panjang gelombang 517 nm dengan waktu inkubasi selama 30 menit sebab gugus kromofor dan auksokrom radikal bebas DPPH akan menyerap absorbansi maksimal pada panjang gelombang 517 nm (Dehpour *et al.*, 2009).

Penelitian yang dilakukan oleh Wikandari *et al.* (2020) yaitu membandingkan pengaruh pemberian NaCl konsentrasi 5% dan perlakuan kontrol terhadap aktivitas antioksidan pada sampel asinan bawang putih. Pada hari fermentasi ke-9, asinan bawang putih dengan NaCl 5% menunjukkan antioksidan yang lebih tinggi yaitu 11,17%; dibandingkan dengan perlakuan kontrol yang hanya mencapai 7,39%. Proses fermentasi dan penambahan NaCl dapat mempertahankan senyawa Allin yang berperan sebagai antioksidan sehingga dapat menghambat radikal bebas DPPH.

Kandungan senyawa tocopherol di dalam kubis putih dilaporkan mencapai 0,008 sampai 0,04 mg tocopherol/100 gram FW (Piironen *et al.*, 1986; Kurilich *et al.*, 1999; Podsedek *et al.*, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Ozer dan Yildirim (2019) serta Astuti dan Syamhudi (2014) terhadap produk olahan *sauerkraut* kubis putih untuk mengetahui aktivitas antioksidannya. Ozer dan Yildirim (2019) melakukan penelitian dengan penambahan NaCl konsentrasi 3% dan waktu inkubasi sampel selama 15 menit. Hasil pengujian antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC<sub>50</sub>, berdasarkan penelitian diperoleh nilai IC<sub>50</sub> sebesar 15,52 mg/mL.

*Sauerkraut* kubis putih yang diinkubasi selama 15 menit menunjukkan efektivitas antioksidan (nilai  $IC_{50}$ ) yang tidak terlalu jauh dengan *sauerkraut* kubis putih yang di inkubasi selama 30 menit, hal tersebut dapat disebabkan karena reaksi yang terjadi antara radikal DPPH dengan sampel di waktu inkubasi belum sempurna sehingga belum menunjukkan hasil yang stabil, seperti yang dijelaskan oleh Supardjan *et al* (2007) bahwa waktu inkubasi menit ke-25 sampai menit ke-40 pada larutan sampel akan memberikan nilai absorbansi yang stabil.

Penelitian yang dilakukan oleh Huang *et al* (2012) dengan metode DPPH terhadap sampel *mustard pickle* yang diekstrak dengan tiga jenis pelarut yaitu etanol, air dan metanol. Penggunaan ketiga jenis pelarut bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan pada sampel yang mengandung garam di dalam pelarut-pelarut tersebut. *Mustard pickle* yang diekstrak dengan etanol menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat, dibandingkan kedua pelarut lainnya. Jika dibandingkan dengan BHT yang berperan sebagai kontrol, aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol *mustard pickle* jauh lebih tinggi yang ditunjukkan dengan nilai  $EC_{50}$  sebesar 0,55 mg/ml, sedangkan nilai  $EC_{50}$  pada BHT adalah 20,7  $\mu$ g/ml.

Tingginya aktivitas antioksidan pada sampel yang diekstrak dengan etanol juga ditemukan di dalam penelitian yang dilakukan oleh Kasminah (2016). Podungge *et al.* (2018). Özer dan Yıldırım (2019) dimana penggunaan larutan etanol menghasilkan jumlah *yield* dan antioksidan yang lebih tinggi. Seperti yang terlampir pada Tabel 2., bahwa sampel yang menggunakan pelarut etanol menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi. Hal ini dijelaskan oleh Haryoto dan Frista (2019) menjelaskan bahwa etanol memiliki kemampuan larut yang lebih baik di dalam DPPH. Marinova dan Batchvarov (2011) menambahkan penjelasan teorinya bahwa penggunaan pelarut etanol pada sampel akan memperoleh hasil yang lebih presisi

Penggunaan larutan etanol khususnya pada produk fermentasi sebenarnya telah dilakukan penelitian pada tahun 1980-an, pengembangan penelitian yang dilakukan oleh Malinowski dan Daugulis (1994) melaporkan bahwa penggunaan pelarut etanol di dalam sampel yang

mengandung garam menyebabkan terjadinya peningkatan koefisien distribusi etanol yang dibarengi dengan terjadinya penurunan aktivitas air. Dalam penelitiannya dijelaskan pula bahwa ketika garam ditambahkan ke dalam larutan aquos, garam akan bergabung dengan molekul air. Proses ini akan membentuk kelompok molekul air disekitar ion, selanjutnya akan terjadi hidrasi ion yang mengakibatkan hilangnya molekul air di dalam pelarut, hal inilah yang mempengaruhi aktivitas non elektrolit pada larutan.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Divya *et al* (2016) terhadap sampel *Citrus aurantium* yang diekstrak dengan pelarut metanol dan air, dimana sampel yang diekstrak dengan pelarut metanol menunjukkan antioksidan yang paling tinggi. Penelitian terhadap sampel *Citrus aurantium* dalam bentuk *pickle* dengan penambahan NaCl konsentrasi 18,5% yang difermentasi selama 6 bulan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terus terjadi penurunan antioksidan dari hari ke-0 fermentasi yaitu 62,3 mol/g sampai bulan ke-6 fermentasi menjadi 20,9 mol/g. Penambahan garam dengan konsentrasi terlalu tinggi justru menurunkan antioksidan, sama seperti dengan penelitian Baatour *et al* (2017) dimana penambahan garam 100mM menunjukkan terjadinya penurunan antioksidan, sedangkan penambahan garam di 75mM menunjukkan peningkatan antioksidan yang signifikan. Menurut Pitzschke et al. (2006) penambahan garam sebetulnya dapat melindungi terjadinya pemicu degradasi protein dan mutasi DNA, menambah stimulasi sistem antioksidan seperti katalase dan peroxidase.

Hasan dan Sarfaz (2018) melaporkan penelitiannya terhadap produk asinan sayuran yang terdiri dari wortel, cabai hijau, labu lobak. Penelitian dilakukan dengan tiga perlakuan, yaitu penambahan NaCl 0 gram (kontrol), 3 gram dan 4 gram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan NaCl 4 gram menunjukkan hasil % inhibisi antioksidan tertinggi yakni sebesar  $87.56 \pm 0.02\%$ , kemudian diikuti oleh penambahan NaCl 3 gram yang mencapai  $83.23 \pm 0.07\%$ , Sedangkan, perlakuan kontrol menunjukkan hasil % inhibisi antioksidan yang paling rendah.

Penelitian lain dilakukan oleh Pirbalouti et al (2013) pada sampel *Kelussia odoratisima* *pickle* dengan konsentrasi NaCl 3%; 5%, 7% dan 9%. Berdasarkan penelitiannya, sampel

yang diuji dengan metode DPPH menunjukkan antioksidan terbaik pada perlakuan konsentrasi NaCl 3% yakni  $71.3 \pm 0.01\%$ , sedangkan perlakuan 5%, 7% dan 9% NaCl berturut-turut adalah  $70.4 \pm 0.03\%$ ;  $70.1 \pm 0.01\%$ ;  $67.5 \pm 0.01\%$ . Analisis data dengan metode Pearson menunjukkan bahwa senyawa flavonoid memiliki korelasi yang tinggi terhadap metode DPPH ( $r = 0,994$ ). Hal serupa ditemukan oleh Son et al (2016) pada pengujian sampel *Mustard pickle* dimana senyawa flavonoid menunjukkan korelasi yang tinggi pada pengujian antioksidan dengan metode DPPH.

Penambahan NaCl saat fermentasi menyebabkan keluarnya cairan di dalam bahan karena terjadinya proses osmosis. Cairan yang keluar dari dalam bahan dapat membawa komponen-komponen yang larut di dalam air seperti senyawa fenolik, sehingga pada sampel berbahan polar kandungan antioksidan yang terkandung dapat menurun, dan sebaliknya dapat terjadi kenaikan kandungan antioksidan pada sampel berbasis non polar. Seperti yang dijelaskan oleh Montano *et al* (2004) di dalam penelitiannya pada fermentasi bawang putih yang menjelaskan bahwa penambahan garam dan proses fermentasi yang dilakukan dapat menyebabkan kandungan  $\alpha$ -tocopherol meningkat, hal ini terjadi karena adanya peningkatan persentase kandungan lipid di dalam bawang putih, sehingga menyebabkan hilangnya komponen yang larut air.

#### **4.2. METODE FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

Berdasarkan Tabel 3., dapat dilihat bahwa pengukuran sampel menggunakan metode FRAP menggunakan panjang gelombang 595 nm, yang diinkubasi pada suhu ruang dengan waktu inkubasi kisaran 7 sampai 95 menit, sedangkan menurut Bibi et al (2020) waktu inkubasi yang diperlukan dalam metode FRAP adalah 30 menit. Prinsip dari metode FRAP yaitu terbentuknya warna biru akibat reduksi ferric-tripyridyltriazine ( $\text{Fe(III)TPTZ}^{3+}$ ) menjadi ( $\text{Fe(II)TPTZ}^{3+}$ ) (Benzie dan Strain, 1999).

Penelitian yang dilakukan Yin dan Cheng (1998) dengan metode FRAP terhadap penambahan NaCl pada *Allium Foods* dengan konsentrasi 0,2 dan 0,4 M tidak memberikan efek antioksidan dan prooksidan apapun pada sampel.

Hal serupa, penelitian yang dilakukan oleh Abacan *et al* (2017) terhadap sampel empat spesies *mushrooms* diantaranya adalah *A.bisporus*, *P.florida*, *P.ostreatus*, dan *T.cartilaginous* dengan penambahan NaCl konsentrasi 0, 2, 4, 6 g/L. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan NaCl tidak memberikan efek aktivitas antioksidan apapun. Efek NaCl terhadap aktivitas antioksidan atau bahkan sebagai prooksidan dapat diakibatkan oleh ion besi, dimana semakin rendah atau hilangnya ion besi maka semakin besar efek penghambatan NaCl (Kanner *et al.* 1988)

Penelitian terhadap sampel yang sama yaitu *Mustard Pickle* dilakukan oleh Son *et al* (2016) dan Fang *et al* (2008). Son *et al* (2016) melakukan penelitian pada sampel *Mustard Pickle* yang diekstrak dengan pelarut etanol dan metanol. Berdasarkan data penelitian, diketahui terjadi penurunan antioksidan pada kedua ekstrak sampel *Mustard Pickle* (ekstrak etanol dan metanol). Penurunan antioksidan mulai terjadi di hari ke-14 fermentasi sampai hari terakhir waktu fermentasi yakni pada hari ke-28, pada ekstrak metanol terjadi penurunan dari 3,82 QE mg/g menjadi 2,59 QE mg/g, dan penurunan pada ekstrak etanol terjadi dari 2,80 QE mg/g menjadi 1,97 QE mg/g. Dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap senyawa antioksidan berupa  $\alpha$ -tocopherol, diketahui bahwa penambahan garam tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan terhadap metabolisme  $\alpha$ -tocopherol.

Penelitian yang dilakukan oleh Fang *et al* (2008) terhadap sampel *Mustard Pickle*, menunjukkan bahwa pada akhir waktu fermentasi yakni minggu ke-5, perlakuan *mustard pickle* dengan 10 g/100 g NaCl menunjukkan total antioksidan yang lebih tinggi yaitu 38.1 TEAC mg/g DW dibandingkan dengan penambahan 5 g/100 g NaCl yang hanya mencapai 31 TEAC mg/g DW. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi NaCl yang ditambahkan akan mempengaruhi kekuatan antioksidan. Namun, pada penambahan garam 10 g/100 g NaCl jika dibandingkan dengan waktu fermentasi pada minggu sebelumnya ke waktu terakhir fermentasi, terlihat bahwa terjadi penurunan, dari 47.3 TEAC mg/g DW. menjadi 38.1 TEAC mg/g DW.

Penurunan total antioksidan yang terjadi di dalam pengujian dapat disebabkan oleh penambahan konsentrasi NaCl yang terlalu tinggi sehingga aktivitas NaCl di dalam sampel tersebut bersifat sebagai prooksidan seperti yang telah dijelaskan oleh Mabrouk & Dugan (1960) yang menyebutkan bahwa NaCl dapat memberikan efek prooksidan yang kuat, selain itu Molyneux (2004) juga menambahkan bahwa konsentrasi antioksidan terlalu tinggi (khususnya golongan fenolik) dapat terjadi penurunan aktivitas antioksidan atau justru mengakibatkan terjadinya prooksidan atau hilangnya kemampuan antioksidan.

Penelitian lain dilakukan oleh Shin (2020) pada sampel Selada dengan konsentrasi NaCl 0; 50; 100; 200; 300; 400 mM menggunakan metode FRAP dengan waktu simpan selama 8 hari. Pengaruh konsentrasi NaCl di analisa menggunakan uji varian satu arah. Hasil pengujian menunjukkan bahwa pada hari penyimpanan terakhir (hari ke-8) antioksidan tertinggi terdapat pada perlakuan kontrol kemudian diikuti oleh perlakuan 50; 100; 200 dan 300 mM, sedangkan perlakuan NaCl 400 mM menunjukkan antioksidan terendah. Uji varian satu arah yang dilakukan menunjukkan bahwa adanya hubungan yang signifikan antara penambahan konsentrasi NaCl dan waktu penyimpanan terhadap aktivitas antioksidan. Dalam penelitiannya, dilaporkan bahwa adanya korelasi positif dari senyawa fenolik terhadap antioksidan yang diuji dengan metode FRAP. Pirbalouti et al (2013) melakukan uji korelasi dengan metode Pearson pada produk *pickle*, hasil uji korelasi menunjukkan bahwa pada metode FRAP senyawa fenolik berkorelasi signifikan dengan aktivitas antioksidan ( $r = 0,994$ ). Hal ini semakin diperkuat dengan hasil penelitian lain yang dilakukan oleh Son et al (2016) pada sampel *Mustard pickle* dimana senyawa fenolik menunjukkan korelasi tinggi dengan metode FRAP.

### 4.3. METODE FOSFOMOLYBDATE

Mekanisme metode phosphomolybdate yaitu berdasarkan reduksi molybdenum (VI) ke bentuk molybdenum (V) oleh komponen antioksidan dan ditandai dengan terjadinya pembentukan warna hijau molybdenum (V) kompleks yang diukur dengan absorbansi maksimum yaitu pada 695 nm (Prieto *et al.*, 1999).

Divya *et al* (2016) melakukan penelitian terhadap sampel *Citrus aurantium* yang diekstrak dengan metanol dan air. Penggunaan dua jenis pelarut bertujuan untuk mengetahui pengaruh larutan ekstraksi terhadap antioksidan selama proses *pickling*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa sampel yang diekstrak dengan metanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi. NaCl ditambahkan dalam proses fermentasi *Citrus aurantium*, pada hari ke-0 fermentasi diketahui antioksidan pada sampel sebesar 53,2  $\mu\text{mol/g}$ , kemudian terus terjadi peningkatan antioksidan dan mencapai optimum saat fermentasi di bulan ke-4 hingga mencapai 75,2  $\mu\text{mol/g}$ , kemudian terus terjadi penurunan hingga akhir waktu fermentasi yaitu pada bulan ke-6 dengan kemampuan antioksidan menjadi 57,8  $\mu\text{mol/g}$ .

Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa penambahan NaCl dengan konsentrasi yang cukup tinggi dalam proses fermentasi dapat meningkatkan antioksidan seperti golongan fenolik atau antioksidan enzimatis, sedangkan penurunan antioksidan di akhir fermentasi dapat disebabkan karena terjadi penurunan kembali beberapa senyawa fenolik akibat waktu fermentasi yang terlalu lama. Hal tersebut dijelaskan oleh Dhairyasheel and Sharad (2015) bahwa semakin tinggi konsentrasi NaCl yang diberikan, maka akan semakin tinggi aktivitas enzim antioksidatif.

Selain garam, penggunaan jenis pelarut pun dilaporkan dapat mempengaruhi hasil pengukuran antioksidan. Ahmed *et al* (2015) melaporkan penelitiannya pada sampel *Adiantum caudatum* dengan penambahan NaCl 0% (kontrol) dan 0,9%, dimana sampel diuji dengan waktu inkubasi 95 menit pada 90°C. Kemudian dilakukan perbandingan kemampuan antioksidan terhadap efek keberadaan garam dan penggunaan tiga jenis pelarut berbeda berupa metanol, hexana dan air. Sampel yang mengandung garam menunjukkan kemampuan antioksidan yang lebih tinggi. Perlakuan NaCl 0,9% dengan pelarut methanol menunjukkan kemampuan antioksidan tertinggi, diikuti dengan NaCl 0,9% dan menggunakan pelarut air, dan tidak aktif saat menggunakan pelarut hexana. Hal tersebut disebabkan oleh komponen alami seperti fenol dan flavonoid yang terkandung di dalam sampel memiliki kemampuan larut di dalam senyawa polar lebih tinggi. Terkait dengan kepolaran jika dibandingkan dengan senyawa  $\alpha$  – tokoferol dan antioksidan lipofilik lainnya yang termasuk dalam

komponen non polar akan menunjukkan kemampuan larut yang rendah, sehingga antioksidan yang terukur pun relatif rendah.

Hal tersebut menunjukkan bahwa pelarut dapat mempengaruhi hasil ekstrak suatu sampel yang nantinya berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan seperti yang dijelaskan oleh Rifai *et al.* (2018) bahwa pelarut dapat menentukan aktivitas antioksidan, tingginya suatu komponen di dalam pelarut menunjukkan bahwa komponen tersebut memiliki kepolaran yang mendekati atau sama dengan pelarut.

Penelitian yang dilakukan oleh Valifard *et al.* (2014) terhadap *Salvia mirzayanii* dengan penambahan NaCl 0; 2,3; 4,5; 6,8; 9,1 mM. Data penelitian ditunjukkan dengan mean  $\pm$  standar deviasi (SD), diperoleh hasil kemampuan antioksidan untuk masing-masing perlakuan konsentrasi NaCl berturut-turut adalah  $2.70 \pm 0.02$ ;  $2.91 \pm 0.01$ ;  $3.24 \pm 0.02$ ;  $3.82 \pm 0.01$ ;  $3.22 \pm 0.04$  mg GAE/g DW. Berdasarkan hasil penelitian tersebut dapat dilihat bahwa pada perlakuan NaCl 6,8 mM terjadi peningkatan kemampuan antioksidan jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol. Peningkatan kemampuan antioksidan yang terjadi diduga karena adanya reaksi peningkatan senyawa fenolik di dalam bahan, seperti penelitian yang dilakukan oleh Pirbalouti *et al.* (2013) terhadap produk *pickle* yang melakukan uji korelasi dengan metode Pearson, hasil menunjukkan bahwa senyawa fenolik menunjukkan korelasi positif terhadap metode fosfomolybdate ( $r = 0,989$ ).