

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN KEDONDONG HUTAN (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz.) DENGAN BERBAGAI METODE UJI

Submitted : 8 April 2019

Edited : 15 Mei 2019

Accepted : 25 Mei 2019

Suhaimi Azizah, Nursamsiar, Syamsu Nur

Bagian Kimia Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar
Km 13,7, Daya, Makassar
Email: syamsunur19@gmail.com

ABSTRACT

*The leaf of kedondong hutan (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz.) Contain of flavonoid compound, which capable as antioxidants that function for preventing free radicals. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity profile of ethanol extract of kedondong hutan leaf with DPPH, ABTS radical and iron reduction methode (FRAP). This study used experimental research with stages of sample collection, plant determination, simplicia preparation, maceration with 70% ethanol, phytochemical screening and antioxidant activity assay with UV-Vis spectrophotometry. The results obtained from the ethanol extract of kedondong hutan leaves had antioxidant activity on DPPH and ABTS with IC_{50} of 32.83 ppm and 45.84 ppm respectively. In FRAP method kedondong hutan leaves had antioxidant activity which is equivalent to quarcetin of 2936.7 $\mu\text{mol QR /g}$ sample. Ethanol extract of kedondong hutan leaves has very strong antioxidant power against DPPH, ABTS radical and iron reduction.*

Keywords : *Spondias pinnata* (L.F.) Kurz., Antioxidants, and DPPH, ABTS radical and iron reduction (FRAP)

PENDAHULUAN

Reactive Oxygen Species (ROS) merupakan suatu produk alami yang terbentuk dari metabolisme aerobik normal dalam tubuh yang secara potensial dapat menyebabkan kerusakan⁽¹⁾. Radikal bebas yang dihasilkan dalam reaksi biokimia tubuh, terlibat sebagai mediator pada berbagai penyakit. ROS dalam jumlah yang berlebihan dapat menyerang molekul biologis yang selanjutnya dapat menyebabkan kerusakan sel atau jaringan, dan dihubungkan dengan berbagai penyakit degeneratif⁽²⁾. Pada penelitian lebih lanjut telah diteliti bahwa sekitar 40 penyakit mencakup aterosklerosis, hipertensi, iskemik, alzheimer, parkinson,

kanker dan peradangan disebabkan oleh radikal bebas⁽³⁾.

Antioksidan dapat menangkap radikal bebas dan mendetoksifikasinya⁽⁴⁾. Antioksidan sintetik, seperti ter-butil hidroksitoluen (BHT) dan ter-butil hidroksianisol (BHA), tersedia secara komersial, dan saat ini digunakan dalam proses industri, karena diduga sebagai promotor efek samping karsinogenesis dan efek negatif lainnya, maka penggunaan antioksidan sintetik dalam makanan, produk kosmetik, dan sediaan farmasi telah menurun.

Pada saat ini, antioksidan alami yang berasal dari tanaman herbal menjadi pilihan masyarakat⁽⁵⁾. Tanaman yang dapat

dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami salah satunya adalah kedondong hutan (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz.). Berdasarkan penelitian Dwija dkk (2013) ekstrak metanol daun *S. pinnata* menunjukkan adanya kandungan triterpenoid dan flavonoid⁽⁶⁾. Flavonoid merupakan kandungan metabolit sekunder yang bersifat sebagai senyawa bioaktif⁽⁷⁾ yang mampu bertindak sebagai antioksidan yang berfungsi untuk menangkal radikal bebas⁽⁸⁾.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan daun *S. pinnata* dengan metode peredaman radikal DPPH, ABTS dan reduksi besi (FRAP).

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan yaitu aquadest, etanol p.a, etanol 70%, HCl, pereaksi mayer, pereaksi wagner, pereaksi dragendrof, serbuk Mg, FeCl₃, kloroform, asam asetat anhidrat, asam sitrat, HCl, H₂SO₄ pekat, 1,1-difenil-2-pikrilhidrail (DPPH) (Sigma aldrich), (2,2-Azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat) (ABTS) (Sigma aldrich), kalium persulfat, (asam klorida, besi (III) klorida (Sigma aldrich), 2,4,6 tri-pyridyl-s-triazine (TPTZ) (Tokyo chemical industry), kuarsetin, daun kedondong hutan (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz).

Penyiapan Sampel

Daun kedondong hutan yang diperoleh, selanjutnya dilakukan sortasi basah. Daun dikumpulkan dan dicuci dengan air bersih mengalir dan ditiriskan. Selanjutnya dirajang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan hingga diperoleh simplisia. Selanjutnya simplisia ditimbang sebanyak 230 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi, ditambahkan dengan etanol 70% sebanyak 2 L

didiamkan selama 3 hari dan sesekali diaduk kemudian disaring. Residu yang diperoleh diremaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 1,5 L. Filtrat yang diperoleh, dikumpulkan dan dipekatkan dengan diangin-anginkan sampai diperoleh ekstrak kental.

Uji Skrining Fitokimia

Sampel dilakukan uji fitokimia kualitatif untuk mengetahui beberapa senyawa metabolit meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoi/steroid, dan saponin. Hal pertama yang perlu dilakukan ialah pembuatan larutan ekstrak etanol daun kedondong hutan mula-mula ekstrak kental ditimbang sebanyak 0,5 gram, lalu dilarutkan dengan etanol sampai 10 mL di dalam labu, selanjutnya dilakukan pengujian skrining fitokimia⁽⁹⁾.

Penentuan Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan tiga pengujian yang berbeda yaitu: 1,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), (2,2-Azinobis (3etilbenzotiazolin)-6-asamsulfonat) (ABTS) dan Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) dengan sedikit modifikasi.

Pengujian DPPH,

Secara ringkas disiapkan larutan DPPH 0,4 mM dan dibuat seri konsentrasi sampel 25 µg/mL, 50µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL dan 125 µg/mL dari larutan stok sampel daun kedondong 1000 µg/mL, selanjutnya masing-masing seri konsentrasi larutan sampel ditambahkan 1 mL larutan DPPH, selanjutnya masing-masing campuran larutan sampel dan larutan DPPH dicukupkan volumenya dengan etanol p.a hingga 5 mL. Didiamkan selama 30 menit diukur absorbansi dengan Spektrofotometer UV-Vis dalam panjang gelombang 515 nm.

Nilai IC_{50} direpresentasikan berdasarkan konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi 50 % DPPH yang mana nilainya diperoleh dari grafik regresi linier.

Pengujian ABTS

Pembuatan larutan seri konsentrasi sampel 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 70 $\mu\text{g/mL}$ dan 80 $\mu\text{g/mL}$ dari larutan stok ekstrak daun kedondong 1000 $\mu\text{g/mL}$ dan ditambah 1 mL larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol absolut dan diinkubasi selama 15 menit lalu serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

Pengujian Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

Disiapkan larutan ferric chlorida (3 mM dalam 5 mM asam sitrat) dan larutan TPTZ (1 mM dalam 0,05 M asam klorida). 0,2 mL larutan sampel ditambahkan dengan 2 mL larutan TPTZ, diinkubasi selama 3 menit selanjutnya ditambahkan 0,1 mL larutan FeCl_3 dan dicukupkan volume air suling hingga 5 mL diukur serapannya pada panjang gelombang 600 nm.

Data absorbansi dihitung terhadap seri konsentrasi larutan standar kuersetin dan dicatat sebagai equivalent dengan $\mu\text{mol/g}$ sampel.

Analisis Data

Analisis data yang digunakan merupakan analisis deskriptif dimana menggambarkan atau menjelaskan hasil yang diperoleh berdasarkan nilai pada hasil kurva kalibrasi dengan persamaan garis lurus $y = bx + a$, dimana profil aktivitas antioksidan diperoleh dengan menginterpolasikan nilai absorpsi sampel sebagai nilai (y) sehingga profil aktivitas

antoksidan sebagai nilai (x) pada sampel dapat diketahui.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Skrining Fitokimia

Serbuk simplisia daun kedondong hutan yang diperoleh, selanjutnya diekstraksi dengan metode maserasi. Larutan penyari yang digunakan dalam proses ekstraksi adalah etanol 70%. Penggunaan cairan penyari etanol 70% bertujuan untuk menarik semua komponen di dalam serbuk simplisia, karena pelarut etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik senyawa-senyawa yang larut dalam pelarut non polar hingga polar⁽¹⁰⁾. Ekstraksi daun kedondong hutan dilakukan selama 3 hari dengan sesekali pengadukan, diperoleh hasil rendemen sebanyak 5,10%.

Hasil Skrining Fitokimia

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia

No.	Golongan Senyawa Kimia	Hasil
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	+
3.	Tanin	+
4.	Terpanoid/Steroid	+
5.	Saponin	+

Ket: (-) menunjukkan hasil negatif

(+) menunjukkan hasil positif

Berdasarkan tabel di atas diperoleh bahwa hasil uji fitokimia ekstrak daun kedondong hutan memiliki kandungan flavonoid, tanin, terpenoid/steroid dan saponin.

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kedondong hutan dengan metode peredaman radikal DPPH berdasarkan

hilangnya warna ungu akibat tereduksinya DPPH oleh antioksidan yang diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 515 nm. Hilangnya warna ungu adalah stoikiometri jumlah elektron yang disumbangkan oleh senyawa antioksidan daun kedondong hutan⁽¹¹⁾. Sedangkan uji antioksidan dengan metode ABTS berdasarkan hilangnya warna biru akibat tereduksinya ABTS oleh antioksidan. Intensitas warna biru ini diukur pada panjang gelombang 750 nm. Antioksidan dalam sampel daun kedondong hutan menekan produksi warna ini ke tingkat yang sebanding dengan sampel⁽¹²⁾.

Konsentrasi tiap sampel kemudian diukur pada spektrofotometer UV-Vis dengan kuersetin murni sebagai kontrol positif. Mekanisme kuersetin sebagai antioksidan sekunder adalah dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai radikal bebas atau dengan cara menangkapnya⁽¹³⁾. Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Pada pengujian aktivitas antioksidan (Tabel 2) dengan metode DPPH

menunjukkan ekstrak etanol daun kedondong hutan mempunyai kemampuan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 32,83 µg/mL dengan mentransfer elektron atau donor proton. Namun jika dibandingkan dengan kontrol positif kuersetin 2,18 µg/mL menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kedondong hutan memberikan aktivitas antioksidan yang masih rendah. Hal ini dikarenakan kuersetin merupakan senyawa murni golongan flavonoid yang secara cepat mampu meredam radikal DPPH jika dibandingkan dengan larutan sampel yang masih berupa ekstrak kasar.

Pada pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS senyawa yang bertanggung jawab memiliki mekanisme dalam penangkapan radikal bebas melalui pemutusan rantai reaksi radikal dengan jalan memberikan atau mendonorkan radikal hidrogen secara cepat⁽¹⁴⁾. Hasil menunjukkan ekstrak etanol daun kedondong hutan mempunyai kemampuan aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 45,84 µg/mL dengan pengukuran kontrol positif kuersetin dengan nilai IC₅₀ sebesar 4,69 µg/mL.

Tabel 2. Hasil Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kedondong Hutan

Sampel	Inibisi (%) pada konsentrasi (µg/mL) metode DPPH					Inibisi (%) pada konsentrasi (µg/mL) Metode ABTS				
	25	50	75	100	125	40	50	60	70	80
Ekstrak	37,13±1,1	63,3±2,2	75,9±2,0	84,9±0,9	88,5±0,7	32,9±1,1	57,5±1,5	85,0±1,2	92,0±0,14	95,3±0,07
IC ₅₀ *			32,83					45,84		
IC ₅₀ **			2,18					4,69		

Ket: *inhibitor konsentrasi larutan ekstrak

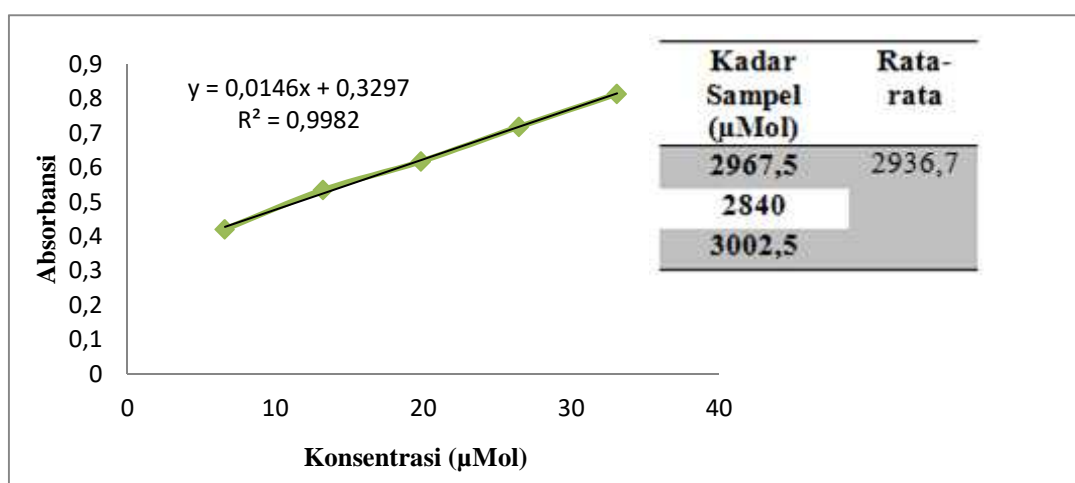
**inhibitor konsentrasi larutan kuersetin (kontrol positif)

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kedondong hutan juga diuji dengan metode peredam reduksi besi (FRAP). Pengujian FRAP merupakan uji kolorimetri yang mengukur kemampuan sampel untuk mereduksi besi berdasarkan dengan mekanisme reaksi fenton oleh pengkkelat ion logam dari Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} yang ditandai dengan peningkatan intensitas warna menjadi biru *prussian* dari larutan sampel⁽¹⁵⁾. Pembentukan warna biru akan menaikkan absorbansi sampel ketika pengukuran dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 600 nm sehingga akan mengubah absorbansi yang menunjukkan kenaikan daya reduksi. Besarnya daya reduksi suatu sampel menunjukkan kemampuannya sebagai donor elektron dan dapat bereaksi dengan radikal untuk mengubahnya menjadi stabil serta mengakhiri rantai radikal⁽¹⁵⁾. Penentuan kapasitas antioksidan dihitung dengan menggunakan kurva baku kuersetin.

Penentuan aktivitas antioksidan metode FRAP berdasarkan persamaan regresi linier dari kurva baku equivalen kuersetin (Gambar 1) dan ditentukan IC_{50}

berdasarkan persamaan regresi linier antara sampel banding kadar equivalen Fe dalam μMol . Persamaan kurva baku yang digunakan $y = 0,0146x + 0,3297$ dengan nilai $r = 0,9982$. Selanjutnya dari data absorbansi yang diperoleh, dapat dilihat aktivitas antioksidannya dengan menggunakan persamaan *quersetin equivalent antioxidant capacit* (QEAC). Dari hasil pengujian diperoleh aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kedondong yang dinyatakan ekuivalen dengan kuersetin sebesar 2936,7 $\mu mol/g$ sampel. Semakin besar nilai QEAC maka kemampuan senyawa dalam reduksi besi juga semakin besar.

Aktivitas ekstrak etanol daun kedondong hutan berdasarkan beberapa pengujian menunjukkan adanya kapasitas antioksidan pada metode pengujian yang berbeda. Pada pengujian antioksidan dengan metode radikal DPPH dan ABTS menunjukkan aktivitas yang sangat kuat dalam meredam radikal. Hasil yang serupa juga diperoleh dari ekstrak kedondong hutan memiliki kemampuan yang sangat kuat dalam mereduksi besi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} .



Gambar 1. Kurva baku kuersetin antara absorbansi vs konsentrasi kuersetin ($\mu g/mL$)

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa, uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun kedondong hutan (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz) dengan metode peredaman radikal DPPH dan metode ABTS memberikan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC₅₀ berturut-turut sebesar 32,83 µg/mL dan 45,84 µg/mL sedangkan aktivitas antioksidan dalam mereduksi besi sebesar 2936,7 µmol/g sampel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Benzie, I.F. and Strain, J.J.1996, The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power" the FRAP assay, *Jurnal Anal Biochem*, Vol.239 (1). Hal 70-6.
2. Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi Moghaddam, P., Barl, B. and Weil, J.A., 2004, Free-radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of Selected Plant Species From The Canadian Prairies, *Jurnal Food Chem*, Vol. 84. Hal.551-562.
3. Behera, U. K., Jha, K. P. and Mahapatra, I. C. 2004, Integrated management of available resources of the small and marginal farmers for generation of income and employment in eastern India, *Crop Research*, 27: 83-89
4. Kumaran, A., and Karunakaran, R.J. 2005, Antioxidants Activities of Methanol Extracts of Five, *Phyllanthus urinaria*.*Jurnal Food and Chemical Toxicology*, Vol. 46. Hal. 2485-2492.
5. Li, P., Huo, L., W., Lu, R., Deng, C., Liu, L., Deng, Y., Guo, N., Lu, C. and He, C. 2011, Free Radical Scavenging Capacity, Antioxidant Activity and Phenolic Content of (*Pouzolzia zeylanica*), *College of Pharmacy, J. Serb. Chem, Soc*, Vol.76 (5). Hal.709-717.
6. Dwija, I.B.N.P., Juniarta, I.K., Yowani, S.C., dan Ariantari, N.P. 2013, Aktivitas Antituberkulosis Ekstrak Metanol Daun Kedondong Hutan (*Spondias pinnata* (L.F.) Kurz.), *Jurnal Kimia*, Vol. 7 (1): 25-30.
7. Sarker, S. D., dan Nahar, L. 2009, Kimia untuk Mahasiswa Farmasi Bahan KimiaOrganik, Alam dan Umum. Yogyakarta: Pustaka Pelajar. Hal: 501-502
8. Dungir, S. G., Dewa, G. K., dan Vanda, S. K. 2012, Aktivitas Antioksidan dan Ekstrak Fenolik dari Kulit Buah Manggis, *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. Jurusan Kimia. FMIPA. UNSRAT, Manado.(1) 11-15.
9. Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis. Tumbuhan. Terjemahan Kosasih P dan Iwang SJ., ITB Bandung.
10. Snyder, C. R., J. J. Kirkland, dan J. L. Glajach. 1997, Practical HPLC Method Development, Second Edition, New York: John Wiley and Sons, Lnc, Hal. 722-723.
11. Jain P, Bhuiyan MH, Hossain KR, Bachar SC. Antibacterial and antioxidant activities of local seeded banana fruits, *African J of Pharmacy and Pharmacolo*, 2011;5(11):1398-140
12. Miller N.J, Rice – Evans C, et.al. 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin Sci*, 84. 407 – 412.
13. Winarsi, H., 2007, Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
14. Vaya, J., Aviram, M., 2001. Nutritional antioxidant mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. *Curr. Med. Chem.-Immunol. Endocr. Metab. Agents* 1, 99–117
15. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., Özyurt, D., 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules* 12, 1496–1547