

**SKRINING SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DAN UJI AKTIVITAS
ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETILASETAT DAUN WEDUSAN
(*Eupatorium odoratum*)**

Purwati, Undri Rastuti

Program Studi Kimia, Jurusan MIPA, Fakultas Sains dan Teknik UNSOED

ABSTRACT

Oxidation process is a natural process which always occurs in fat. The process affects and decreases the fat quality. Oxidation in fat can be hampered by the addition of antioxidant. Antioxidant activity of wedusan leaf has to be studied to know the possibility of wedusan leaf as an antioxidant. Hence, the aims of the research were to determine the antioxidant activity of ethyl acetate extract of wedusan leaf using TBA method, and to compare the antioxidant activity of wedusan leaf and that of BHT. The research method consisted of sample preparation, extraction, and determination of antioxidant activity using TBA method. Wedusan leaf was extracted by maceration using n-hexane and ethyl acetate solvents. The n-hexane extract was 2.90 gram, whereas ethyl acetate extract was 13.12 gram. Based on qualitative screening on secondary metabolites, ethyl acetate extract contained flavonoid. The results from GC-MS indicated that ethyl acetate extract contained methyl heptadecanoic, methyl-13-octadecenoic, 14,16-octadecadienal, and octadecanoic acid. The order of inhibition activity of antioxidant were 0.05% (w/v) of BHT > 0.15% (w/v) of ethyl acetate extract > 0.10% (w/v) of ethyl acetate extract > 0.05% (w/v) of ethyl acetate extract.

Keywords : antioxidant, TBA, BHT, Wedusan

PENDAHULUAN

Penggunaan antioksidan pada minyak telah banyak dilakukan diantaranya menggunakan antioksidan sintetik seperti Butyl Hidroksi Anisol (BHA) dan Butil Hidroksi Toluen (BHT), tetapi saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi. Hasil penelitian Ford.*et al* (1980) dalam Indriati (2002) menunjukkan bahwa antioksidan sintetik seperti BHT ternyata dapat meracuni binatang percobaan dan bersifat karsinogenik, sehingga akan membahayakan bagi kesehatan. Oleh karena itu, perlu dikembangkan penggunaan antioksidan alami dan mencari sumber-sumber antioksidan yang baru.

Menurut Trilaksani (2003) golongan senyawa fenolat seperti: flavonoid memiliki sifat-sifat antioksidan

baik dalam lemak cair seperti minyak goreng dan dalam makanan berlemak. Senyawa tersebut dapat memberikan atom hidrogen secara cepat ke radikal lemak atau minyak yang terbentuk selama pemanasan atau mengubah menjadi bentuk yang lebih stabil. Sementara radikal antioksidan yang terbentuk pada reaksi tersebut lebih stabil dibandingkan dengan radikal lemak baru, dengan demikian flavonoid dapat melindungi lemak dari reaksi oksidasi.

Tanaman wedusan (*Eupatorium odoratum* L) merupakan tanaman yang sangat mudah tumbuh (tumbuh liar di mana-mana) dan sangat banyak, bahkan sangat tidak disukai masyarakat karena dianggap sebagai tanaman yang mengganggu yang sulit diberantas. Penelitian fitokimia terhadap daun wedusan mengandung senyawa flavonoid

isosakuranetin dan kaemferida (Matsyeh, 1987). Dalam ekstrak etil asetat daun wedusan ditemukan senyawa flavonoid jenis flavonol, dihidroflavonol, khalkon dan flavon (Purwati, 2003). Penelitian lebih lanjut tentang metabolit sekunder yang lain untuk tanaman wedusan ini belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, peneliti melakukan skrining senyawa metabolit sekunder dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etilasetat daun wedusan agar mempunyai nilai lebih terutama untuk antioksidan alami, karena sampai saat ini baru digunakan sebagai pakan ternak.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun wedusan yang diambil di Arcawinangun, Purwokerto Timur, n-heksana, etilasetat, asam linoleat, larutan FeCl_3 25% (b/v), HCl pekat, methanol absolute, serbuk Mg, larutan buffer fosfat 0,1 M pH 7, larutan trikloroasetat (TCA), 20% (b/v), larutan thiobarbiturat 0,67% (b/v), larutan BHT 0,05% (b/v), dan akuades.

Peralatan penelitian antara lain : blender merk Philip, *Rotary evaporator* Buchi, timbangan digital, timbangan analitik, mikropipet, oven, Spektrofotometer UV-Vis Milton Roy Company Spectronic 20D, alat-alat gelas dan GC-MS QP-2010S merk SHIMADZU.

Cara Kerja

Penyiapan sampel

Daun wedusan dipilih yang tidak jamur, dicuci dengan air sampai bersih, dikeringkan, kemudian diblender sampai menjadi serbuk.

Maserasi

Sebanyak 150 gram serbuk daun wedusan diekstraksi secara maserasi dengan n-heksana sampai semua serbuk terendam selama 24 jam sambil sesekali

diaduk. Setelah 24 jam dilakukan penyaringan sehingga didapat filtrat dan residu. Residu dimaserasi kembali dengan n-heksana seperti perlakuan sebelumnya sampai didapat filtrat yang sudah jernih (minimal 3 kali maserasi).

Residu hasil maserasi dengan pelarut n-heksana dikeringkan dengan diangin-anginkan. Setelah kering, residu dimaserasi dengan etilasetat seperti perlakuan dengan n-heksana. Sehingga akan didapat ekstrak etilasetat. Ekstrak etilasetat ini diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* Buchi sehingga diperoleh ekstrak etilasetat pekat. Ekstrak selanjutnya ditimbang, kemudian dilakukan skrining senyawa metabolit sekunder, uji aktivitas antioksidan dan identifikasi dengan GC-MS.

Skrining senyawa metabolit sekunder (Harborne, 1987)

Alkaloid (Uji Dragendorff)

Ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2 N, dipanaskan selama 5 menit, disaring, kemudian ditambahkan 5 tetes pereaksi Dragendorff. Hasil positif adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan oranye/jingga.

Flavonoid (Uji Shinoda)

Ekstrak dilarutkan dalam methanol 50% (v/v), kemudian ditambahkan serbuk Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Adanya senyawa flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah tua/jingga.

Fenol (Uji dengan FeCl_3)

Ekstrak dilarutkan dalam akuades 10 mL, dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtrat ditambahkan 4-5 tetes pereaksi FeCl_3 2,5% (b/v). Adanya senyawa fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau hitam.

Saponin (Metode Forth)

Ekstrak ditambahkan dalam akuades 10 mL, kemudian dikocok selama 30 detik. Adanya senyawa saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1 cm dan tetap stabil selama 30 detik.

Uji Aktifitas Antioksidan

Pembuatan Larutan Uji (Boer, 2000)

Sampel yang akan diuji dibuat dengan cara menambahkan 16 mL buffer fosfat 0,1 M pH 7 dan 20 mL asam linoleat 0,05% (v/v) ke dalam 4 mL masing-masing ekstrak etil asetat daun wedusan 0,05%; 0,10% dan 0,15% (b/v). Sebagai kontrol adalah asam linoleat dengan perlakuan yang sama tanpa penambahan ekstrak etil asetat daun wedusan. Kemudian sebagai pambanding terhadap sampel digunakan antioksidan BHT 0,05% (b/v).

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum (Boer, 2000)

Sebanyak 4 mL larutan uji BHT 0,05% (b/v) ditambah 2 mL larutan TBA 0,67% (b/v) dan 4 mL TCA 20% (b/v) diinkubasi dalam oven dengan suhu 60^oC selama 24 jam. dan didinginkan selama 1 jam. Kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 450-600 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan absorbansi tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum dari larutan.

Penentuan Waktu Setimbang (Boer, 2000)

Sebanyak 4 mL larutan uji BHT 0,05% (b/v) ditambah 2 mL larutan TBA 0,67% (b/v) dan 4 mL TCA 20% (b/v) diinkubasi dalam oven dengan suhu 60^oC selama 24 jam. Setelah itu larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dari 10-100 menit setelah pemanasan. Pengukuran dilakukan setiap 10 menit. Waktu setimbang ditunjukkan dengan absorbansi yang paling stabil pada menit tertentu setelah pemanasan.

Pengukuran Absorbansi (Boer, 2000)

Sebanyak 4 mL larutan uji BHT 0,05% (b/v) ditambah 2 mL larutan TBA 0,67% (b/v) dan 4 mL TCA 20% (b/v) diinkubasi dalam oven dengan suhu 60^oC selama 24 jam. Kemudian didinginkan selama waktu setimbang dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan setiap 1 hari selama 7 hari inkubasi. Perlakuan yang sama dilakukan untuk larutan uji sampel ekstrak etil asetat daun wedusan dan kontrol.

Perhitungan Persentase Penghambatan Oksidasi (Faeda dkk, 2001)

Persentase penghambatan oksidasi dihitung dengan menggunakan rumus;

$$\% \text{ Penghambatan} = \frac{A_k - A_s}{A_k} \times 100\%$$

Keterangan :

A_k : Absorbansi kontrol

A_s : Absorbansi sampel

Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak etilasetat dengan GC-MS

Identifikasi senyawa dalam ekstrak etilasetat dilakukan dengan menggunakan alat GC-MS QP-2010S merk SHIMADZU di Laboratorium Kimia Organik Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Maserasi

Ekstraksi daun wedusan dilakukan dengan metode maserasi tanpa pemanasan dengan tujuan senyawa-senyawa target terekstrak dan tidak mengalami dekomposisi. Pelarut yang digunakan pada maserasi berturut-turut n-heksana dan etil asetat. Pelarut n-heksana digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa non polar yang akan mengganggu pada proses uji antioksidan, sedangkan etil asetat digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa semi

polar yang menurut referensi senyawa-senyawa fenolat seperti aglikon flavonoid sebagian besar terekstrak pada pelarut etil asetat. Hasil ekstraksi maserasi daun wedusan setelah dipekatkan dapat dilihat dalam Tabel 1.

Skrining Senyawa Metabolit Sekunder

Skrining senyawa metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa menggunakan pereaksi warna tertentu. Skrining senyawa metabolit sekunder masing-masing ekstrak disajikan dalam Tabel 2.

Tabel 1. Hasil Maserasi

Ekstrak	Warna	Bentuk	Berat Ekstrak (gr)	Rendemen (%b/b)
n-heksana	Hijau tua	Pasta	2,9	1,933
Etilasetat	Hijau tua	Pasta	13,12	8,747

Tabel 2. Identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan pereaksi warna

No	Uji	Metode Uji	Ekstrak etil asetat
1.	Saponin	Forth	(-) tidak terbentuk busa
2.	Fenol	Uji dengan FeCl ₃	(+) Hijau keunguan
3.	Flavonoid	Shinoda	(+) ada endapan merah kecoklatan
4.	Alkaloid	Dragendorff	(-) Filtrat hijau kekuningan Tidak ada endapan

Berdasarkan hasil skrining senyawa metabolit sekunder ekstrak etil asetat dapat disimpulkan bahwa dalam ekstrak etil asetat mengandung senyawa golongan flavonoid.

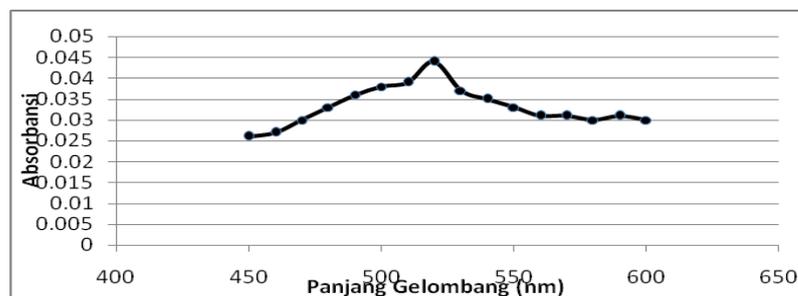
Uji Aktivitas Antioksidan

Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji disimpan dalam oven yang suhunya diatur tetap 60 °C selama 24 jam Tujuan penyimpanan larutan uji dalam oven adalah untuk mempercepat proses oksidasi lemak yaitu asam linoleat.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum diperlukan untuk menetapkan serapan zat maksimum terhadap sinar pada panjang gelombang tertentu. Grafik hasil pengukuran absorbansi untuk mengetahui panjang gelombang maksimum disajikan pada Gambar 1. Dari grafik terlihat bahwa panjang gelombang maksimum untuk larutan uji BHT diperoleh pada 520 nm.



Gambar 1. Grafik Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan Waktu Setimbang

Waktu setimbang reaksi ditentukan pada panjang gelombang maksimum yakni 520 nm. Waktu Setimbang dicapai dengan melihat kestabilan absorbansi pada rentang waktu tertentu. Grafik pengamatan waktu setimbang disajikan pada Gambar 2.

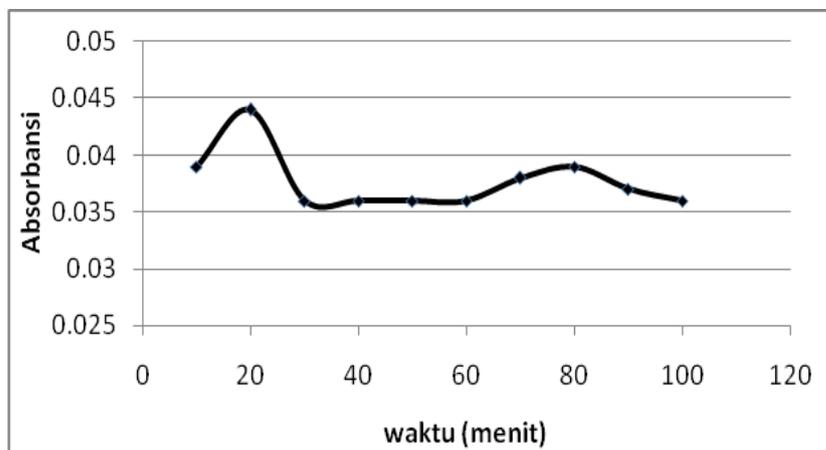
Grafik penentuan waktu setimbang digunakan untuk melihat kestabilan absorbansi yang ditunjukkan dengan garis mendatar pada grafik. Waktu setimbang mengindikasikan bahwa reaksi antara pereaksi TBA dengan produk sekunder oksidasi asam linoleat telah mencapai kesetimbangan. Berdasarkan Gambar 2 kestabilan absorbansi dicapai setelah waktu 30 menit yakni pada absorbansi 0,036.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan

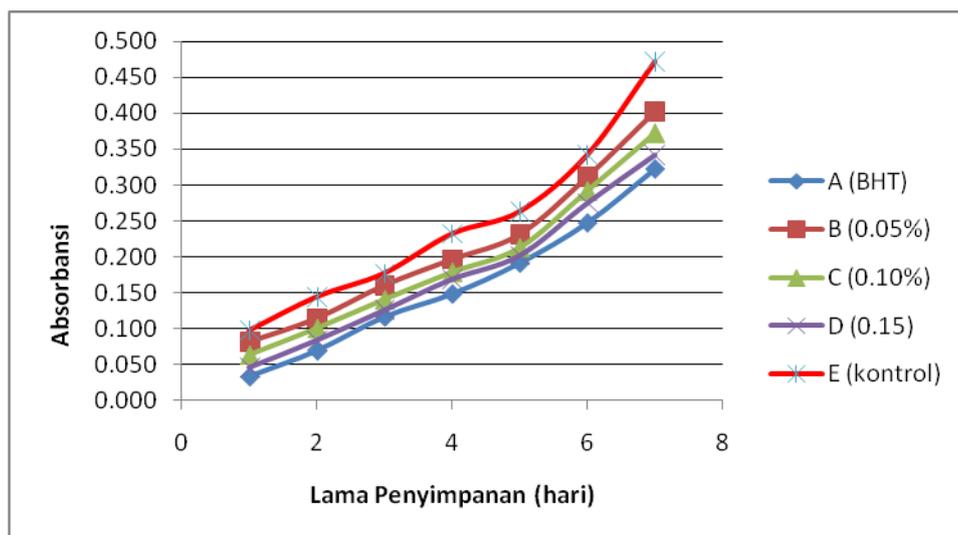
Pengukuran absorbansi dilakukan pada larutan uji yakni 4 mL larutan uji

BHT 0,05% (b/v), larutan ekstrak etil asetat 0,05% (b/v), 0,10% (b/v), 0,15% (b/v), dan control yang masing-masing ditambahkan dengan 2 mL TBA 0,67% (b/v) dan 4 mL TCA 20% (b/v) kemudian dioven pada suhu 60 °C.

Pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat dilakukan dengan metode TBA yakni mengukur absorbansi senyawa kompleks yang terbentuk dari reaksi antara TBA dengan hasil oksidasi sekunder asam linoleat pada panjang gelombang 520 nm, setelah dibiarkan pada waktu setimbang 30 menit, Pengukuran absorbansi dilakukan 7 hari. Nilai absorbansi cenderung meningkat dari hari ke 1 hingga hari ke 7 karena semakin lama waktu penyimpanan menaikkan proses oksidasi. Data pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 2. Grafik penentuan waktu setimbang



Gambar 3. Grafik pengukuran aktivitas antioksidan

Larutan uji BHT dan larutan sampel yang mengandung ekstrak etil asetat 0,05% (b/v), 0,10% (b/v) dan 0,15% (b/v) mengalami kenaikan konsentrasi tetapi tak setajam kontrol, ini disebabkan adanya penambahan senyawa yang bersifat antioksidan. Senyawa antioksidan ditambahkan ke dalam suatu bahan untuk menghambat reaksi oksidasi dengan udara (Scott,1963). Namun, antioksidan hanya berfungsi menghambat reaksi oksidasi dan tidak dapat menghentikan sama sekali proses autooksidasi pada lemak sehingga pada akhir proses ketengikan akan selalu terjadi. Hal ini sesuai dengan pendapat Hadiyono dkk (2002) dalam Yuliantini (2005) bahwa penambahan senyawa antioksidan pada minyak akan menyebabkan terhambatnya

pembentukan produk sekunder terutama malonaldehid. Malonaldehid ini diidentifikasi dengan TBA menghasilkan warna merah muda. Semakin pekat warna yang dihasilkan menunjukkan semakin meningkat proses oksidasi pada asam linoleat.

Perhitungan Persentase Penghambatan Oksidasi (Faeda dkk, 2001)

Absorbansi yang diperoleh dari masing-masing larutan uji, kemudian dihitung persentase penghambatannya yakni dengan menghitung pembagian antara selisih nilai absorbansi sampel dan kontrol. Besarnya nilai penghambatan proses oksidasi dari masing-masing larutan uji dan kontrol sebagai hasil nominal dari nilai persentase penghambatan dapat dilihat pada Tabel 3.

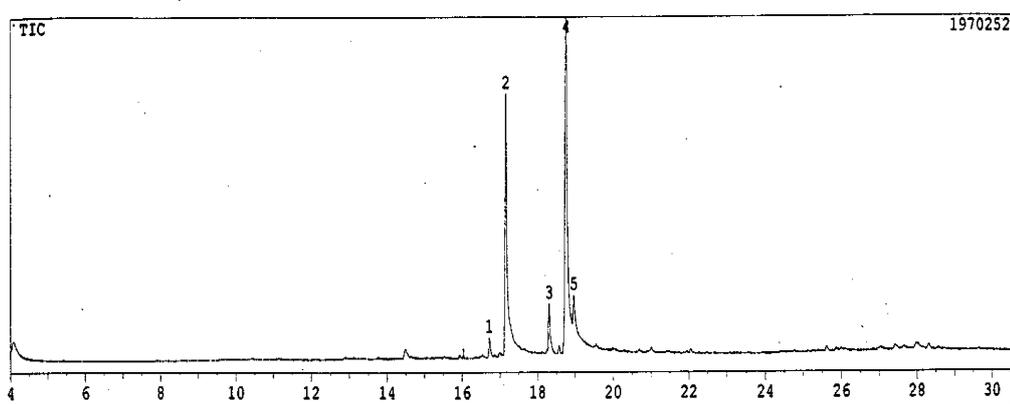
Tabel 3 Persentase penghambatan oksidasi asam linoleat oleh BHT dan etil asetat terhadap kontrol dengan metode TBA

Sampel	Waktu inkubasi (hari)						
	1	2	3	4	5	6	7
A	65,979	52,083	34,463	36,207	27,376	27,778	31,780
B	15,464	20,139	9,040	15,086	11,787	8,772	14,619
C	47,143	29,861	20,339	22,845	19,011	14,620	21,186
D	52,577	41,667	28,814	27,155	23,194	19,591	27,542

Dari Tabel 3 terlihat bahwa persentase penghambatan sample A (BHT, sebagai kontrol positif) mempunyai persentase penghambatan terbesar, hal ini dikarenakan BHT merupakan senyawa murni sedangkan sample B, C, dan D merupakan ekstrak kasar yang mengandung banyak senyawa yang kemungkinan ada yang tidak mempunyai aktivitas sebagai antioksidan.

Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etil asetat dengan GC-MS

Hasil analisa/identifikasi senyawa dalam ekstrak etil asetat dengan GC-MS dapat dilihat pada Gambar 4. Waktu retensi dan kelimpahan relatif puncak-puncak kromatogram dari ekstrak etil asetat disajikan pada Tabel 4.



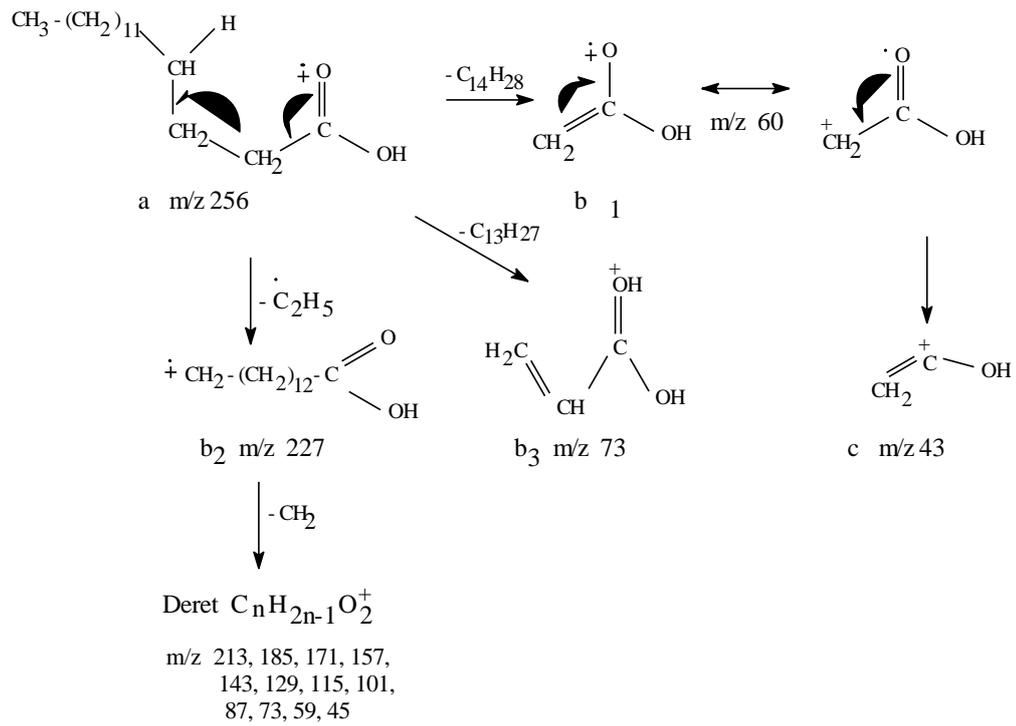
Gambar 4. Kromatogram Ekstrak Etil asetat

Tabel 4 Waktu retensi dan klimpahan relatif puncak-puncak kromatogram ekstrak etil asetat daun wedusan dengan GC-MS

No.Puncak	Waktu retensi (menit)	Kelimpahan relatif (%)
1	16,719	1,93
2	17,171	33,32
3	18,312	5,19
4	18,783	51,33
5	18,972	8,22

Berdasarkan spektra massa dari tiap puncak dan setelah dibandingkan spektra standar dari literatur komputer (*library*), kelima puncak tersebut berturut-turut adalah metil heptadekanoat, asam heksadekanoat,

14,16-oktadekadienal dan asam oktadekanoat. Fragmentasi 2 puncak utama kromatogram ekstrak etil asetat disajikan pada Gambar 5 dan Gambar 6.



Gambar 5. Mekanisme fragmentasi asam heksadekanoat yang diusulkan

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

1. Ekstrak etil asetat daun wedusan berdasarkan skrining senyawa metabolit sekunder mengandung senyawa flavonoid, dengan GC-MS teridentifikasi adanya metil heptadekanoat, asam palmitat, metil 1,3-oktadekanoat, 14,16-oktadekadienol dan asam oktadekanoat.
2. Komponen utama dalam ekstrak etil asetat daun wedusan berdasarkan GC-MS adalah asam palmitat dan 14,16-oktadekadienol.
3. Senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak etil asetat daun wedusan memiliki aktivitas antioksidan dengan urutan aktivitas penghambatan sebagai berikut BHT 0,05% (b/v) > larutan ekstrak etil asetat 0,15% (b/v) > larutan ekstrak etil asetat 0,10% (b/v) > larutan ekstrak etil asetat 0,05% (b/v) > kontrol.

Saran

Perlu pemurnian lebih lanjut dengan kromatografi kolom untuk mendapatkan senyawa murni yang memiliki aktivitas antioksidan

DAFTAR PUSTAKA

- Boer, Y.2000. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq). *Jurnal matematika dan IPA* No.1 (1) : 26-33.
- Elisabeth, J. 2002. *Ragam Minyak Goreng* (On Line) Kompas Cyber Media, www.google.com. Diakses 15 Januari 2009
- Faeda, U. A. Muhtady dan M. Mulyono. 2001. Aktivitas Antioksidan In

Vitro Ekstrak Metanol Kulit kayu Angsana. *Prosiding Seminar Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XVII*. Puslitbang Kimia Terapan LIPI. Bandung

- Fessenden, R.J. dan Fessenden, J.S., 1993, *Organic Chemistry*, third edition, Wadsworth, California (diterjemahkan oleh Pudjaatmaka, A.H., 1999, "Kimia Organik", Erlangga, Jakarta).
- Harborne, J.B., Mabry, H., dan Mabry, T.J. 1975. *The Flavonoid*, first edition, Chapman and Hall, London.
- Indriati, A. 2002. *Analisis Aktivitas Pada Buah Jambu Mete* (On Line) Biosains, [Http:// digilib. Brawijaya.ac.id/ virtual serial/pdf](http://digilib.Brawijaya.ac.id/virtual/serial/pdf). Diakses 15 Januari 2005
- Ketaren, S. 1988. *Minyak dan Lemak Pangan*, Penerbit UI, Jakarta.
- Lawrence, H.M., 1958, *Taxonomy of Vascular Plants*. third edition, pp.438, 726-730, The Mac Millan Company, New York.
- Matsjeh, S., 1987. Hasil-hasil Semulajadi dari Beberapa Obat Tradisional Melayu. *disertasi*. Universitas Sains Malaysia, Malaysia
- Purwati. 2003. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Organik Dalam Daun *Eupatorium odoratum*. *Tesis*. FMIPA. UGM. Yogyakarta.
- Pratt dan Hudson. 1990. *Flavonoids as Antiooxidants*. Institute of Advanced Biomedical Technologies. National Council of Research. Italy

Trilaksani, W.2003. *Antioksidan : Jenis, Sumber, Mekanisme, Kerja dan Peran terhadap Kesehatan* (Online), www.Google.com. Diakses tanggal 15 Januari 2005

Widjaya,.2003. Peran Antioksidan Terhadap Kesehatan Tubuh. *Health Choise*, Edisi IV.

Winarno.,F.G. 1988. *Kimia Pangan dan Gizi*. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta.