

## UJI PENANGKAPAN RADIKAL 2,2-DIFENIL-1-PIKRILHIDRAZIOLEH EKSTRAK ETANOL BUNGA KECOMBRANG (*Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan) DAN BUAH TALOK (*Muntingia calabura* L.)

### *Free Radical Scavenging Activity of 2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazilfrom Ethanolic Extract of Kecombrang (*Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan) Flower and Talok (*Muntingia calabura* L.) Fruit*

Tatang Irianti<sup>1\*</sup>), Hari Purnomo <sup>2)</sup>, dan Kuswandi <sup>2)</sup>  
Sindu Nuranto<sup>2)</sup>, Damiana Nitya Kanistri<sup>2)</sup>, Yosi Bayu Murti<sup>2)</sup>, Sofa Farida<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Pharmacy, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

<sup>2)</sup>Faculty of Vocational School, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

<sup>3)</sup>B2P2TOOT, Badan Litbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan RI, Indonesia

\*e-mail: intanti@ugm.ac.id

#### ABSTRACT

The process of excessive free radicals in our body plays a major part in the development of chronic and degenerative illness such as cancer, autoimmune disorders, aging, cataract, rheumatoid arthritis, cardiovascular and neurodegenerative diseases. The recently study reported that free radical and oxidants play a dual role as both toxic and beneficial compounds, since they can be either harmful or helpful to the body. Therefore, natural antioxidants can be explored to prevent degenerative diseases and in the present paper we have investigated antioxidant activity of extracts from *Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan flower and *Muntingia calabura* L. fruit for its free radical scavenging activity using 2,2-diphenyl, 1-picryl hydrazil (DPPH) radical scavenging activity. The results revealed that both ethyl acetate fractions of *N. speciosa* and *M. calabura* have the highest antioxidant activity with  $IC_{50}$  29.81 and 14.48  $\mu\text{g/ml}$  respectively. The antioxidant activity of both ethanolic extracts were more potent than hexan and water fractions with  $IC_{50}$  39.27 and 137.20  $\mu\text{g/ml}$  respectively. The investigation of  $IC_{50}$  values indicated that the antioxidant activity show moderate to very active. Active compounds were identified using thin layer chromatography with  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ , 2,4-DNPH and anisaldehyde- $\text{H}_2\text{SO}_4$  spray reagents. Chromatogram of ethyl acetate fraction showed that spots on the  $R_f$  12 and 56 were thought to contain phenolic compounds with a carbonyl group, while the  $R_f$  37 was suspected flavone compounds with 3-OH group and the  $R_f$  50 was alleged the ortho-dihydroxy flavone or ortho hydroxy and free carbonyl. Chromatogram of ethyl acetate of talok fruits fraction showed that spots on the  $R_f$  19.31 and 44 were suspected flavone compounds with ortho-hydroxy-carbonyl group and or ortho-hydroxy.

**Keywords:** Antioxidant activity, DPPH, *Nicolaia speciosa*, *Muntingia calabura*

#### ABSTRAK

Radikal bebas berlebih dalam tubuh dapat memicu tumbuhnya sel kanker, penyumbatan pembuluh jantung, kerusakan oksidatif otak dan penuaan dini. Hal ini menyebabkan penelitian tentang potensi antioksidan terus mengalami peningkatan, terutama antioksidan alami dari tanaman. Bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan) dan buah talok (*Muntingia Calabura* L.) dilaporkan aktif sebagai antioksidan dan mengandung senyawa aktif dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Oleh

karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas dengan penangkapan radikal bebas fraksi-fraksi ekstrak bunga kecombrang dan buah talok sertakaracterisasi golongan senyawa aktifnya. Hasil fraksinasi ekstrak diuji dengan larutan DPPH 0,4 mM dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Hasil absorbansi sampel dan kontrol diolah untuk mendapatkan persen penangkapan radikal DPPH dan aktivitas antioksidan dievaluasi melalui nilai  $IC_{50}$ . Senyawa aktif diidentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak  $FeCl_3$ ,  $AlCl_3$ , 2,4-DNPH dan anisaldehyd- $H_2SO_4$ . Fraksi-fraksi ekstrak bunga kecombrang dan buah talok menunjukkan tingkat kekuatan antioksidan antara sedang sampai sangat aktif. Fraksi etil asetat bunga kecombrang serta buah talok memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas tertinggi dengan  $IC_{50}$  sebesar 29,81  $\mu g/ml$  dan 14,48  $\mu g/ml$ . Pada fraksi etil asetat ini, buah talok mempunyai potensi aktivitas antioksidan dua kali lipatnya dari bunga kecombrang. Fraksi air, ekstrak etanol serta fraksi heksan bunga kecombrang memiliki  $IC_{50}$  sebesar 39,27  $\mu g/ml$ , 44,08  $\mu g/ml$ , dan 135,36  $\mu g/ml$ . Sedangkan ekstrak etanol, fraksi air serta fraksi heksan buah talok memiliki  $IC_{50}$  sebesar 137,20  $\mu g/ml$ , 282,47  $\mu g/ml$ , dan 2611,70  $\mu g/ml$ . Hasil KLT fraksi etil asetat buah kecombrang menunjukkan bahwa bercak pada  $R_f$  12 dan 56 mengandung senyawa fenolik dengan gugus karbonil, sedangkan  $R_f$  37 diduga senyawa flavon dengan gugus 3-OH dan pada  $R_f$  50 merupakan flavon dengan o-dihidroksi dan atau o-hidroksi karbonil bebas. Kemudian hasil KLT fraksi etil asetat buah talok menunjukkan bahwa bercak dengan nilai  $R_f$  19, 31, dan 44 merupakan flavon dengan gugus o-hidroksi karbonil dan atau gugus o-dihidroksi. Bercak pada  $R_f$  31 juga mengindikasikan adanya senyawa terpenoid.

**Kata kunci:** Aktivitas antioksidan, DPPH, *Nicolaia speciosa*, *Muntingia calabura*

## PENDAHULUAN

Radikal bebas secara alami terbentuk dalam tubuh manusia dari hasil proses metabolisme atau respon sistem kekebalan tubuh. Radikal bebas yang berlebihan dapat bereaksi dengan lipid, asam nukleat, protein, sterol dan gula. Keadaan tersebut dapat memicu tumbuhnya sel kanker, penyumbatan pembuluh jantung, kerusakan oksidatif otak dan penuaan dini (Ozyurt *et al.*, 2007). Oleh karena itu, diperlukan suatu senyawa sebagai penangkal bahaya radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa yang mampu melindungi sel dari efek bahaya radikal bebas oksigen reaktif dengan menghambat atau mencegah proses oksidasi (Pokorny *et al.*, 2001). Penggunaan antioksidan sintesis pada makanan cenderung dihindari karena faktor keamanan dan beresiko menjadi bahan karsinogenik. Antioksidan alami lebih diminati karena lebih aman dikonsumsi sebagai makanan, minuman dan kosmetik (Gordon, 1994). Hal ini menyebabkan penelitian tentang penggalan potensi antioksidan alami dari tanaman terus mengalami peningkatan. Tanaman tersebut diantaranya adalah kecombrang (*Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan) dan buah talok (*Muntingia calabura* L.).

Bunga kecombrang dilaporkan memiliki efek antioksidan kuat terhadap hepar dan sumsum tulang tikus jantan galur Sprague Dawley terinduksi timbal (Jackie *et al.*, 2011). Haleagrahara *et al.*, (2010) menyatakan ekstrak etanol bunga kecombrang mampu meningkatkan enzim penangkap radikal bebas seperti *superoxide dismutase*, *glutathione peroxidase* dan *glutathione S-transferase*. Ekstrak metanol bunga kecombrang juga menunjukkan aktivitas penangkapan radikal DPPH dengan  $IC_{50}$  sebesar 9,14  $mg/ml$  (Lachumy *et al.*, 2010). Lachumy *et al.*, (2010) meneliti adanya kandungan flavonoid, terpenoid, saponin, dan tanin dalam bunga kecombrang. Senyawa golongan fenolik dan terpenoid dari tumbuhan dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai penangkap radikal bebas (Mikova, 2001). Senyawa fenolik diketahui bertindak sebagai antioksidan dengan cara menangkap anion superoksida

danhidroksil radikal (Maslarova, 2001). Kumar (2010) menyebutkan terpenoid mampu menurunkan peroksidasi lipid serta meningkatkan aktivitas dan jumlah enzim antioksidan.

Daun talok digunakan untuk mengobati luka di saluran pencernaan dan ekstrak etanol daun talok memiliki aktivitas antimikrobal (Zakaria *et al.*, 2010). Ekstrak metanol daun talok memperlihatkan aktivitas antioksidan setelah diuji dengan metode DPPH atau *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* karena terbukti adanya kandungan flavonoid di dalamnya (Siddiqua *et al.*, 2010). Sebuah penelitian berhasil mengisolasi senyawa flavanone dari ekstrak etil asetat daun talok dengan menggunakan *quinone reductase induction assay* (Suet *et al.*, 2003). Buah talok mengandung asam askorbat, enzim-enzim, bioflavonoid, serta mineral seperti potasium dan magnesium. Aktivitas antioksidan dalam ekstrak metanol, etil asetat, butanol, petroleum eter, dan kloroform buah talok telah diuji secara *in vitro*, dari uji tersebut diketahui bahwa ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi (Preethi *et al.*, 2010).

Dari penelitian terdahulu, baik bunga kecombrang maupun bunga talok masing-masing sudah ada. Namun, untuk perbandingan tingkat aktivitas antioksidan merupakan suatu kebaruan. Berdasarkan data diatas, perlu dilakukan penelitian untuk mengeksplorasi aktivitas tertinggi penangkapan radikal dari fraksi-fraksi ekstrak etanolik bunga kecombrang dan buah talok. Fraksinasi dilakukan karena adanya variasi struktur senyawa aktif dalam tanaman berdasarkan tingkat kepolarannya. Aktivitas antioksidan didasarkan pada nilai  $IC_{50}$  menggunakan metode DPPH. Nilai  $IC_{50}$  merupakan besarnya konsentrasi untuk menghambat 50% radikal bebas. Penelitian ini diharapkan mampu mengetahui aktivitas penangkapan radikal bebas fraksi-fraksi ekstrak bunga kecombrang dan buah talok serta kekuatan keduanya sebagai antioksidan. Sedangkan, profil kromatografi lapis tipis dapat mengetahui golongan senyawa yang bertanggung jawab dan mampu sebagai acuan dalam pengembangan agen antioksidan.

## **METODE**

### **Tempat dan Waktu Pelaksanaan**

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi UGM dan Laboratorium Kimia Analisis Bagian Kimia Farmasi UGM. Waktu pelaksanaannya, mulai dilakukan awal bulan Februari sampai dengan 15 Desember 2018.

### **Bahan Penelitian**

#### ***Bahan Utama***

Bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa*) diperoleh jam 9 pagi tanggal 3 Februari 2018 dari Desa Kalisoro, Tawangmangu, Karanganyar, sedangkan buah talok (*Muntingia calabura L.*) diambil jam 10 pagi 3 Februari 2018 dari Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Tingkat kematangan buah talok sedang dan berwarna kemerahan. Bunga kecombrang dan buah talok diidentifikasi kebenarannya di Laboratorium Farmakognosi Bagian Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dibersihkan dengan air mengalir, dipotong-potong, dikeringkan, kemudian diserbuk. Serbuk bunga kecombrang dan buah talok diekstraksi dengan metode maserasi selama 5 hari dengan penyari etanol 96 % (Merck) dan dilakukan re-maserasi.

#### ***Fraksinasi dan Uji Penangkapan Radikal DPPH***

Etanol 70% (teknis), n-heksan (teknis), etil asetat (teknis), aquades. metanol p.a, DPPH (Sigma), kuersetin (Merck).

### **Karakterisasi Golongan Senyawa Aktif**

Eluen dalam sistem kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub> (Merck), kloroform (p.a.) dan etil asetat (p.a.). Pereaksi yang digunakan antara lain, DPPH (Sigma), kuersetin (Merck), feri klorida (FeCl<sub>3</sub>), 2,4-dinitrofenilhidrazin (2,4-DNPH), aluminium klorida (AlCl<sub>3</sub>) dan anisaldehyd asam sulfat (Lab. Fitokimia Biologi Farmasi UGM).

### **Prosedur Penelitian**

#### **Ekstraksi**

Ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk bunga kecombrang dan buah talok secara terpisah dengan etanol 96 % (1:10) lalu didiamkan selama 5 hari kemudian disaring. Filtrat disimpan dan ampas di re-maserasikan kembali dengan etanol 96%. Filtrat pertama dan kedua dicampur kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

#### **Fraksinasi**

Ekstrak kental dilarutkan kembali dalam 50 ml etanol 70%. Kemudian dilakukan partisi dengan n-heksan (1:1 v/v) menggunakan corong pisah. Semua fase heksan yang terkumpul selanjutnya disebut fraksi heksan. Fase tak larut heksan kemudian dipekatkan sampai kental untuk selanjutnya disuspensikan dengan aquades dan dipartisi kembali dengan etil asetat (1:1 v/v). Semua fase etil asetat selanjutnya disebut fraksi etil asetat. Fraksi tak larut heksan dan etil asetat disebut fraksi air.

#### **Uji Penangkapan Radikal DPPH**

Sebanyak 1,0 ml DPPH 0,4 mM dimasukkan ke dalam labu takar 5 ml, ditambahkan uji sebanyak 1,0 ml. Selanjutnya ditambah pelarut yang sesuai hingga batas tanda. Larutan kemudian dihomogenkan dengan vorteks selama 1 menit hingga tercampur sempurna kemudian diinkubasi selama 30 menit. Serapan dibaca pada  $\lambda_{517 \text{ nm}}$ . Digunakan blanko berupa larutan sampel dalam metanol dengan kadarsama dengan sampel uji. Masing-masing seri konsentrasi senyawa uji dilakukan replikasi sebanyak dua kali.

### **Karakterisasi Golongan Senyawa Aktif**

Lempeng KLT disemprot dengan pereaksi DPPH 0,2% dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 30 menit. Senyawa antioksidan akan berwarna kuning dengan latar belakang ungu pada sinar tampak (Masoko and Eloff, 2007).

Langkah selanjutnya adalah karakterisasi golongan senyawa aktif dengan penampakan bercak FeCl<sub>3</sub>, 2,4-DNPH, AlCl<sub>3</sub> dan anisaldehyd asam sulfat. Kromatogram diamati pada sinar tampak setelah disemprot FeCl<sub>3</sub>, begitu juga dengan kromatogram yang disemprot pereaksi 2,4-DNPH. Kromatogram setelah disemprot dengan AlCl<sub>3</sub> diamati pada sinar tampak dan dibawah sinar UV 366. Sedangkan kromatogram setelah disemprot dengan anisaldehyd asam sulfat, selanjutnya dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit dan perubahan warna bercak diamati pada sinar tampak (Markham, 1988).

#### **Perhitungan % Penangkapan Radikal DPPH**

Hasil absorbansi sampel dan kontrol diolah untuk mendapatkan persen penangkapan radikal DPPH pada tiap konsentrasi. Selanjutnya dibandingkan persen penangkapan radikal DPPH pada masing-masing fraksi. Besarnya aktivitas penangkapan radikal digunakan rumus:

$$\text{Penangkapan radikal DPPH (\%)} = \frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. kontrol}} \times 100 \%$$

Data kromatogram berupa hRf serta penampakan bercak sebelum dan setelah ditambah pereaksi semprot, diamati dengan sinar tampak, di bawah sinar UV<sub>254</sub> serta UV<sub>366</sub>, penampakan bercak DPPH, FeCl<sub>3</sub>, 2,4-DNPH, AlCl<sub>3</sub> serta anisaldehyd asam sulfat. Kenampakan bercak akan menunjukkan aktivitas antioksidan dan golongan senyawa aktif dari sampel uji.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Ekstrak kental etanolik yang diperoleh pada bunga kecombrang berwarna merah tua dengan rasa pahit dan beraroma khas. Ekstrak kental etanolik serbuk simplisia bunga kecombrang sebesar 19,35 gram dan rendeman ekstrak terhadap serbuk bunga kecombrang sebesar 0,97 %b/b. Hasil partisi terhadap serbuk simplisia bunga kecombrang diperoleh rendemen 22,3 %b/b pada heksan, 19,2 %b/b pada fraksi etil asetat, serta 48,9 %b/b pada fraksi air. Kemudian ekstrak kental etanolik buah talok berwarna kecoklatan dan beraroma khas. Ekstrak kental etanolik serbuk simplisia buah talok sebesar 83,95 gram dan rendemen ekstrak serbuk buah talok sebesar 3,91 %b/b. Hasil partisi dari serbuk simplisia buah talok berupa rendemen sebesar 15,9 %b/b pada fraksi heksan, 1,64 %b/b pada fraksi etil asetat dan 74,5 %b/b pada fraksi air.

Ekstrak etanolik bunga kecombrang dan buah talok serta fraksi-fraksinya diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH. Parameter uji penangkapan radikal DPPH ini adalah IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi senyawa uji (x) dengan persen aktivitas antioksidan (y). Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> senyawa uji, maka semakin poten senyawa uji tersebut sebagai antioksidan.

Fraksi etil asetat merupakan fraksi yang bersifat semi polar. Hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, menunjukkan bahwa fraksi etil asetat bunga kecombrang memiliki aktivitas penangkapan radikal tertinggi dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 29,81 µg/ml. Kemudian harga IC<sub>50</sub> pada ekstrak etanol bunga kecombrang memiliki harga IC<sub>50</sub> sebesar 44,08 µg/ml, diikuti fraksi air (polar) memiliki harga IC<sub>50</sub> sebesar 39,27 µg/ml, dan fraksi heksan (non polar) dengan harga IC<sub>50</sub> sebesar 135,36 µg/ml. Data hasil perhitungan IC<sub>50</sub> dari ekstrak dan fraksi-fraksinya pada bunga kecombrang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil perhitungan IC<sub>50</sub> dari ekstrak dan fraksi-fraksinya pada bunga kecombrang

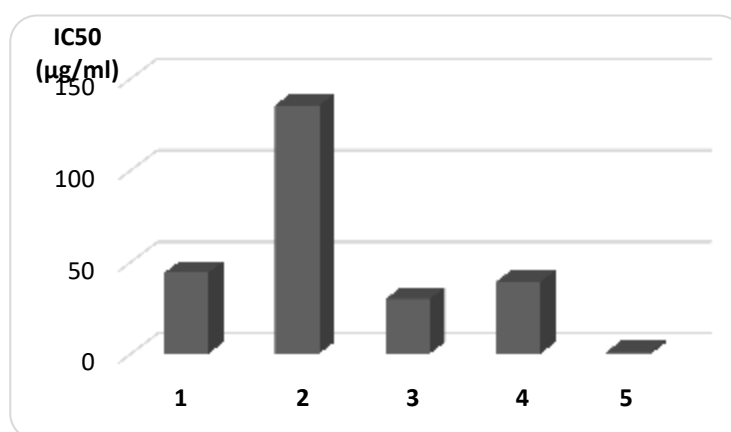
No.	Ekstrak dan Fraksi	n	Persamaan Regresi	r	IC <sub>50</sub> ± SD
1	Ekstrak	3	y = 0,872x + 11,56	0,979	44,08 ± 0,37
2	Fraksi Hexan	3	y = 0,398x - 3,875	0,995	135,36 ± 0,89
3	Fraksi Etil Asetat	3	y = 1,068 x + 18,16	0,981	29,81 ± 0,37
4	Fraksi Air	3	y = 0,583x + 27,10	0,989	39,27 ± 0,11

Aktivitas penangkapan radikal tertinggi dari buah talok dengan nilai IC<sub>50</sub> terendah sebesar 14,48 µg/ml terdapat pada fraksi semi polar, yaitu fraksi etil asetat. Fraksi heksan (non polar) memiliki nilai IC<sub>50</sub> 2611,70 µg/ml, berikutnya adalah fraksi air (polar) dengan nilai 282,47 µg/ml, dan ekstrak etanol dengan nilai 137,20 µg/ml. Nilai IC<sub>50</sub> tertinggi pada fraksi heksan membuktikan bahwa fraksi heksan tidak memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas, walaupun ada aktivitasnya sangat kecil. Semakin tinggi nilai IC<sub>50</sub>, maka semakin rendah aktivitas penangkapan radikal bebasnya, karena semakin besar kadar yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%. Data hasil perhitungan IC<sub>50</sub> dari ekstrak dan fraksi-fraksinya pada buah talok dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil perhitungan IC<sub>50</sub> dari ekstrak dan fraksi-fraksinya pada buah talok

No.	Ekstrak dan Fraksi	n	Persamaan Regresi	r	IC <sub>50</sub> ± SD
1	Ekstrak	3	$y = 0,354x + 1,430$	0,991	137,20 ± 1,01
2	Fraksi Hexan	3	$y = 0,015x + 8,734$	0,980	2611,70 ± 7,12
3	Fraksi Etil Asetat	3	$y = 4,826x - 19,88$	0,983	14,48 ± 0,9
4	Fraksi Air	3	$y = 0,171x + 1,697$	0,991	282,47 ± 0,71

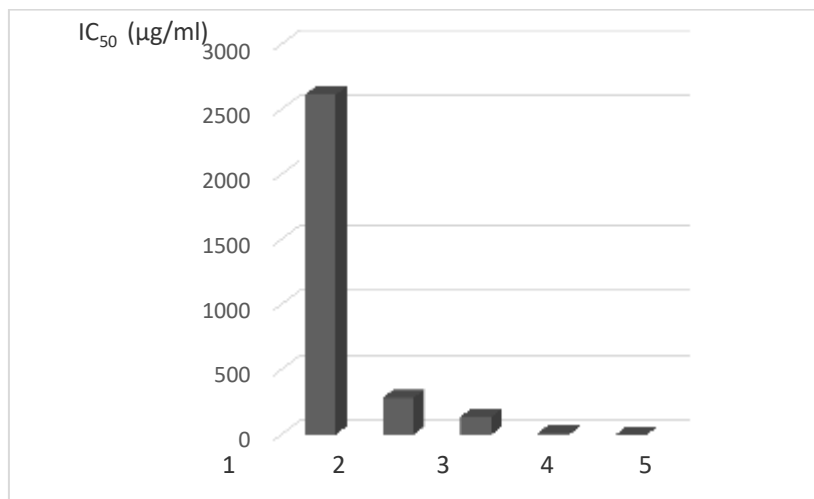
Tahap selanjutnya dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi yang diperoleh dan dibandingkan dengan kontrol positif kuersetin dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar SD 1,16 ± 0,26. Kontrol positif ini digunakan untuk mengetahui apakah sistem yang kita pakai sudah benar sehingga dapat digunakan untuk menguji aktivitas suatu sampel terhadap senyawa penangkap radikal bebas DPPH. Perbandingan IC<sub>50</sub> tiap fraksi dari bunga kecombrang dan buah talok terhadap kontrol positif ditunjukkan dalam suatu histogram pada Gambar 1 dan 2.



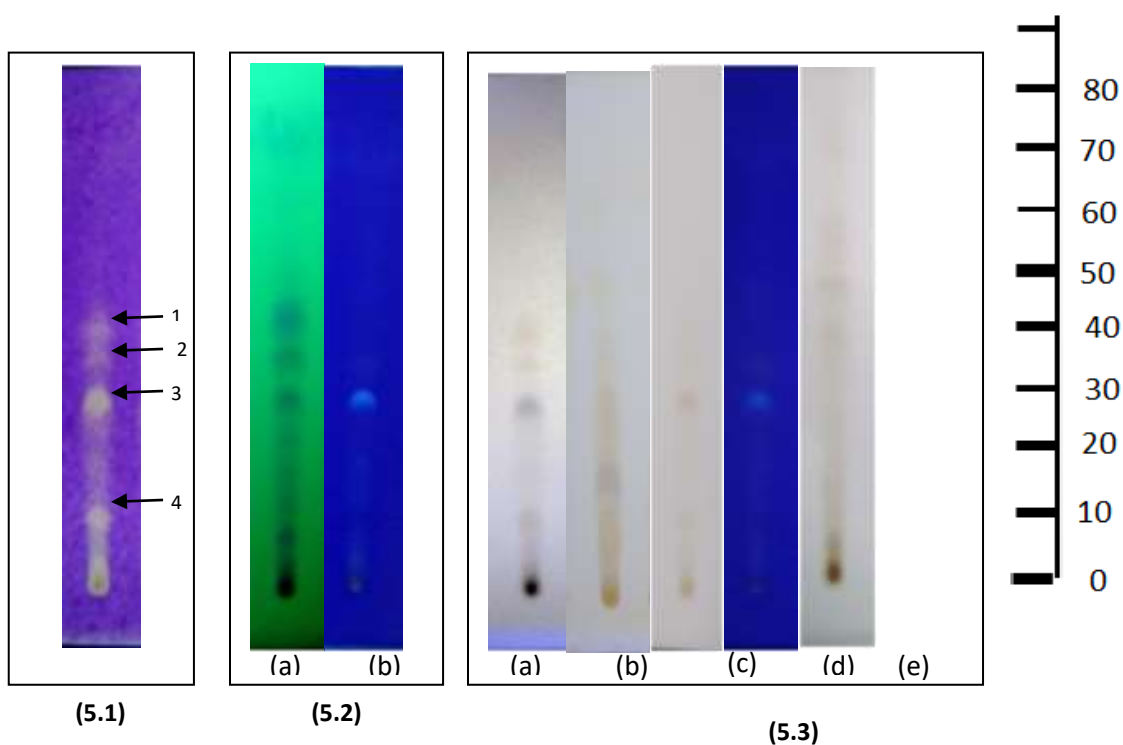
Gambar 1. Histogram nilai IC<sub>50</sub> sampel pada uji penangkapan radikal DPPH bunga kecombrang; Ket.: (1) Ekstrak etanol (44,08 µg/ml); (2) Fraksi heksan (135,36 µg/ml); (3) Fraksi etil asetat (29,81 µg/ml); (4) Fraksi air (39,27 µg/ml); dan (5) Kuersetin (1,16 µg/ml)

### Karakterisasi Golongan Senyawa Aktif

Kromatogram fraksi etil asetat bunga kecombrang disemprot larutan DPPH 0,2% menghasilkan bercak yang diduga mengandung senyawa penangkap radikal bebas pada *hRf* 12, 37, 50 dan 56 (Gambar 3). Sedangkan kromatogram fraksi etil asetat buah talok setelah disemprot DPPH 0,2% menghasilkan bercak dimana diduga mengandung senyawa penangkap radikal bebas pada *hRf* 6, 19, 31, 44, 64 dan 94 (Gambar 4).



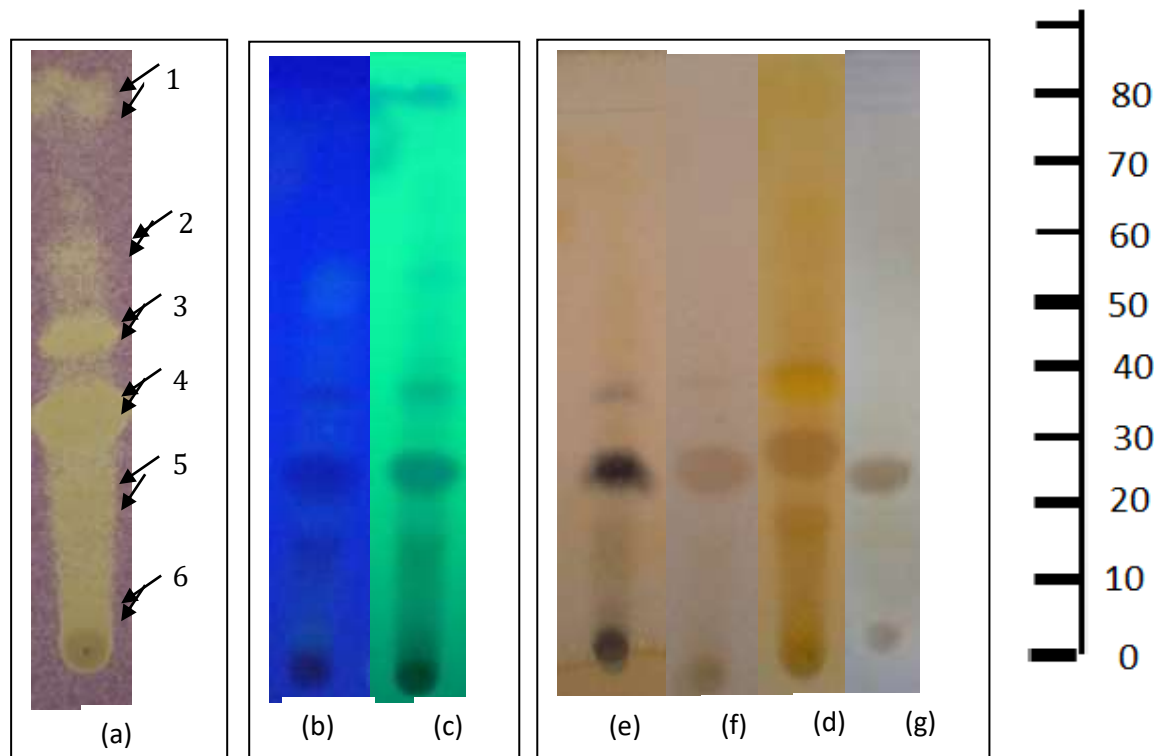
Gambar 2. Histogram nilai IC<sub>50</sub> sampel pada uji penangkapan radikal DPPH buah talok; Ket.: (1) Fraksi heksan (2611,70 µg/ml); (2) Fraksi air (282,47 µg/ml); (3) Ekstrak etanol (137,20 µg/ml); (4) Fraksi etil asetat (14,48 µg/ml); dan (5) Kuersetin (1,16 µg/ml)



Gambar 3. Kromatogram fraksi etil asetat bunga kecombrang dengan fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : etil asetat (2:3 v/v); Ket.: Bercak aktif DPPH (5.1); Kromatogram dilihat di bawah sinar UV 254 (5.2.a) dan di bawah sinar UV 366 (5.2.b); kromatogram setelah disemprot FeCl<sub>3</sub> (5.3.a), kromatogram setelah disemprot 2,4-DNPH (5.3.b), kromatogram setelah disemprot AlCl<sub>3</sub> dilihat di bawah sinar tampak (5.3.c), kromatogram setelah disemprot AlCl<sub>3</sub> dilihat di bawah UV 366 (5.3.d), kromatogram setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat (5.3.e).

Penampak bercak FeCl<sub>3</sub> digunakan untuk mendeteksi senyawa fenol sederhana yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam dengan pengamatan di bawah sinar tampak (Harborne, 1987). Pereaksi 2,4-DNPH mendeteksi adanya gugus karbonil dengan menghasilkan warna kuning sampai kuning-oranye di bawah sinar tampak (Jork *et al.*, 1990).

Penampak bercak  $\text{AlCl}_3$  mengidentifikasi senyawa flavon dengan menghasilkan warna kuning pada sinar tampak dan UV 366 (Markham, 1988). Pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat mengidentifikasi terpenoid dengan warna violet, biru, merah, abu-abu atau hijau serta saponin dengan warna biru-biru violet pada sinar tampak.



Gambar 4. Kromatografi fraksi etil asetat buah talok dengan fase diam silika gel  $\text{F}_{254}$  dan fase gerak toluen:etil asetat: asam formiat (6:4:1); Ket.; Gambar 4 : Bercak aktif DPPH (6.1.a); Kromatogram dilihat di bawah sinar UV 254 (6.2.b) dan di bawah sinar UV 366 (6.2.c); kromatogram setelah disemprot  $\text{FeCl}_3$  (6.3.d), kromatogram setelah disemprot  $\text{AlCl}_3$  dilihat di bawah sinar tampak (6.3.e), kromatogram setelah disemprot 2,4-DNPH (6.3.f), kromatogram setelah disemprot anisaldehyd asam sulfat (6.3.g)

Hasil uji penangkapan radikal DPPH menunjukkan bahwa secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi bunga kecombrang serta buah talok masih di bawah aktivitas antioksidan pembanding yaitu kuersetin ( $1,16 \mu\text{g/ml}$ ). Hal ini dikarenakan kuersetin merupakan senyawa murni sedangkan ekstrak dan fraksi bunga kecombrang serta buah talok diduga masih banyak mengandung senyawa-senyawa lain yang tidak mempunyai aktivitas penangkapan radikal bebas.

Fraksi etil asetat bunga kecombrang memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dari ekstrak etanol, fraksi heksan dan fraksi air. Hal ini dapat dikatakan senyawa dengan efek antioksidan lebih bersifat semi polar. Etil asetat mampu melarutkan senyawa dengan sifat semi polar seperti aglikon flavonoid. Begitupula pada hasil analisis ekstrak buah talok dan fraksinya, membuktikan bahwa senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas penangkapan radikal bebas cenderung bersifat kurang polar, karena banyak terlarut dalam etil asetat. Dengan demikian, walaupun mayoritas senyawa dalam ekstrak etanol cenderung bersifat polar, tetapi



ternyata senyawa bersifat kurang polarlah yang memiliki aktivitas penangkapan radikal bebas tertinggi.

Metode kromatografi lapis tipis digunakan untuk analisis kualitatif dan karakterisasi golongan senyawa pada bunga kecombrang dan buah talok. Hasil analisis KLT bunga kecombrang dan buah talok dapat dilihat pada Tabel 3 dan Tabel 4.

Tabel 3. Bercak yang tampak pada kromatogram bunga kecombrang

hRf	Sebelum disemprot		Setelah disemprot					Interpretasi golongan senyawa
	UV 254	UV 366	FeCl <sub>3</sub>	2,4-DNPH	AlCl <sub>3</sub> Sinar tampak	UV 366	Anisal dehid H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
56	Padam	-	Merah	Kuning-oranye	-	-	-	Fenolik dengan gugus karbonil
50	Padam	Kuning	Biru	Kuning-oranye	kuning	kuning	-	Flavon dengan gugus <i>o</i> -hidroksi karbonil dan atau gugus <i>o</i> -dihidroksi
37	Padam	Biru	Biru gelap	Kuning-oranye	kuning	Biru	-	Flavon dengan gugus 3-OH dan tanpa gugus 5-OH
12	Padam	-	Merah	Kuning-oranye	kuning	-	-	Fenolik dengan gugus karbonil

Keterangan : - = bercak tidak nampak

Analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis terhadap fraksi bunga kecombrang menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak kloroform : etil asetat (2:3 v/v). Sedangkan analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis pada fraksi buah talok menggunakan fase diam silika gel F<sub>254</sub> dan fase gerak toluen:etil asetat: asam formiat (6:4:1). Hasil kromatogram dibawah sinar UV 254 pada fraksi bunga kecombrang, terlihat semua bercak aktif DPPH terjadi pepadaman. Sedangkan pengamatan dibawah sinar UV 254 pada kromatogram fraksi buah talok menunjukkan bahwa hampir semua bercak mengalami pepadaman, kecuali satu bercak dengan nilai *hRf* 19. Bercak dengan nilai *hRf* 19 menunjukkan fluoresensi berwarna hijau. Bercak tersebut kemungkinan mengandung senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi. Diduga senyawa ini adalah golongan fenolik. Senyawa fenolik menyerap di daerah UV pendek dan dapat dideteksi pada pelat silika gel dan mengandung indikator fluoresensi gelombang 254 nm. Senyawa fenolik akan terlihat sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluoresensi (Harborne, 1987).

Tabel 4. Bercak yang tampak pada kromatogram buah talok

hRf	Sebelum disemprot		Setelah disemprot					Interpretasi senyawa	golongan
	UV 254	UV 366	FeCl <sub>3</sub>	2,4-DNPH	AlCl <sub>3</sub> Sinar tampak	UV 366	Anisaldehyde H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
6	-	Hijau	-	-	-	-	-	-	
19	Hijau	Lemba-yung	Hitam-biru	Kuning	Kuning	Kuning	-	Flavon dengan gugus <i>o</i> -hidroksi karbonil dan atau gugus <i>o</i> -dihidroksi	
31	Padam	Lemba-yung	Hitam-biru	Kuning	Kuning	Kuning	Merah-coklat	Flavon dengan gugus <i>o</i> -hidroksi karbonil dan atau gugus <i>o</i> -dihidroksi, serta merupakan senyawa terpenoid	
44	Padam	Kuning	Hitam-biru	Kuning-jingga	Kuning	Kuning	-	-	
64	Padam	Biru	-	Kuning	-	-	-	-	
94	Padam	-	-	Kuning	-	-	-	-	

Keterangan: - = bercak tidak nampak

Hasil kromatogram dibawah UV 366 pada fraksi bunga kecombrang terlihat bercak 2 dengan *hRf* 37 mengalami fluoresensi kuning. Berdasarkan Mabry *et al.* (1970), senyawa fenolik berfluoresensi kuning di bawah UV 366 diduga merupakan flavon dengan 3-OH bebas dengan atau tanpa 5-OH bebas. Bercak 3 berfluoresensi biru kemungkinan adalah flavon dengan gugus 3-OH dan tanpa gugus 5-OH. Kemudian pengamatan dibawah UV 366 pada kromatogram fraksi buah talok, bercak nomor 1 dengan nilai *hRf* 6 tidak menampakkan adanya bercak. Bercak nomor 1 hanya bereaksi positif terhadap penyemprotan DPPH, dan bereaksi negatif terhadap penampak bercak lainnya. Dengan demikian belum dapat diambil kesimpulan lebih dalam mengenai karakteristik golongan senyawa pada buah talok, tetapi dapat dipastikan bahwa bercak nomor 1 ini bukan senyawa fenolik, namun memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH.

Satu-satunya bercak tampak adalah bercak nomor 5 dengan nilai *hRf* 64 dengan fluoresensi warna hijau. Bercak nomor 5 pada fraksi buah talok tidak memberikan perubahan warna setelah penyemprotan AlCl<sub>3</sub> maupun FeCl<sub>3</sub>, dengan demikian senyawa ini bukan merupakan senyawa fenolik, namun bercak ini bereaksi positif terhadap DPPH dan 2,4-DNPH. Maka dapat disimpulkan bahwa bercak nomor 5 ini memiliki gugus karbonil dan mampu menangkap radikal DPPH.

Reaksi positif terhadap pereaksi FeCl<sub>3</sub> dan 2,4-DNPH terlihat pada fraksi bunga kecombrang aktif DPPH. Oleh karena itu, diduga semua bercak aktif DPPH merupakan senyawa fenolik dengan gugus karbonil. Lalu pada fraksi buah talok, hanya 1 bercak saja tak mengalami perubahan warna dengan penampak bercak 2,4-DNPH yaitu bercak nomor 6 dengan nilai *hRf* 94. Pereaksi 2,4-DNPH mendeteksi adanya gugus karbonil dengan menghasilkan warna kuning sampai kuning-oranye di bawah sinar tampak (Jork *et al.*, 1990).

Penampak bercak besi (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) pada bercak dengan nomor 2, 3, serta 4 fraksi buah talok bereaksi positif dengan nilai  $hRf$  19, 31, dan 44. Warna bercak adalah hitam-biru di bawah sinar tampak. Warna hitam biru setelah penyemprotan  $\text{FeCl}_3$ , merupakan bukti adanya senyawa fenolik (Robinson, 1995).

Setelah disemprot dengan  $\text{AlCl}_3$ , fraksi bunga kecombrang dengan  $hRf$  12, 37 dan 50 menunjukkan bercak berwarna kuning pada sinar tampak. Bercak fraksi buah talok menunjukkan adanya perubahan warna pada bercak nomor 2, 3, serta 4 dengan nilai  $hRf$  19, 31, dan 44 menjadi kuning di bawah sinar tampak. Hal ini menunjukkan bahwa bercak mengandung senyawa golongan flavon. Pengamatan kromatogram pada  $hRf$  50 pada sinar tampak dan di bawah sinar UV menunjukkan bercak kuning. Bercak tersebut diduga mengandung flavonoid dengan gugus gugus *o*-dihidroksi (pada cincin B) atau gugus *o*-hidroksi karbonil pada cincin A dan C (Markham, 1988).

Penampak bercak anisaldehyd asam sulfat menunjukkan hasil negatif pada bercak fraksi bunga kecombrang. Bercak nomor 3 fraksi buah talok dengan nilai  $hRf$  31 merupakan satu-satunya bercak yang bereaksi positif terhadap penyemprotan anisaldehyd asam sulfat. Bercak berubah warna menjadi coklat-merah. Pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat akan menunjukkan perubahan warna bagi senyawa terpenoid (Wagner, H., & Blatt, 1996).

Karakterisasi golongan senyawa di atas menunjukkan bahwa senyawa golongan fenolik dan flavonoid bertanggung jawab terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas dari bunga kecombrang. Lalu pada karakterisasi golongan senyawa dengan KLT, merupakan suatu bukti bahwa golongan senyawa fenolik bertanggung jawab terhadap aktivitas penangkapan radikal bebas dari buah talok. Senyawa dengan gugus OH seperti senyawa fenolik serta flavonoid mampu mendonorkan atom hidrogennya kepada radikal bebas DPPH dan mengubahnya menjadi senyawa non-radikal (Molyneux, 2004). Semakin banyak donor atom hidrogen maka semakin poten senyawa tersebut sebagai antioksidan. Ikatan rangkap terkonjugasi dengan karbonil pada flavonoid mampu menstabilkan diri melalui pengaturan ulang elektron (*electron rearrangements*) sehingga tidak ikut berubah menjadi radikal (Bors, W. *et al.*, 1990; Foti *et al.*, 1996). Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai acuan dalam pengembangan agen antioksidan alami yang lebih murah, efektif, aman, dan aplikatif di masyarakat.

## KESIMPULAN

Fraksi etil asetat baik bunga kecombrang (*Nicolaia speciosa* (Bl.) Horan) maupun buah talok (*Muntingia calabura* L.) memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan  $\text{IC}_{50}$  sebesar 29,81  $\mu\text{g/ml}$  dan 14,48  $\mu\text{g/ml}$ . Pada fraksi etil asetat ini, buah talok mempunyai potensi aktivitas antioksidan dua kali lipatnya dari bunga kecombrang. Sedangkan pada bunga kecombrang untuk fraksi air dan ekstrak etanol mempunyai nilai  $\text{IC}_{50}$  yang hampir sama yaitu 39,27  $\mu\text{g/ml}$  dan 44,08  $\mu\text{g/ml}$ . Nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanol pada buah talok lebih kecil dibanding fraksi airnya sebesar 137,20  $\mu\text{g/ml}$  dan 282,47  $\mu\text{g/ml}$ . Hasil KLT bunga kecombrang menunjukkan bahwa bercak pada  $hRf$  12 serta 56 diduga mengandung senyawa fenolik dengan gugus karbonil, sedangkan pada  $hRf$  37 diduga merupakan senyawa flavon dengan gugus 3-OH serta pada  $hRf$  50 diduga mengandung senyawa flavon dengan *orto*-dihidroksi dan atau *orto*-hidroksi karbonil bebas. Sedangkan, pada buah talok hasil KLT menunjukkan bahwa bercak dengan nilai  $hRf$  19, 31, dan 44 merupakan flavon dengan gugus *o*-hidroksi karbonil dan atau gugus *o*-dihidroksi, pada  $hRf$  31 juga mengindikasikan adanya golongan senyawa terpenoid.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Frau Prof. Ulrike Holzgrabe (Wuerzburg Univeristy) dan Deutscher Akademischer AustauschDienst (DAAD) Jerman atas saran serta bantuannya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bors, W., Hellen, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as Antioxidants: Determination on Radical-Scavenging Effeciencies. *Methods Enzymol.* Vol. 186, pp. 343-355. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86128-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86128-I)
- Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M. T., Ruberto, G., Chimiche, S., Doria, V. A., & Catania, I. (1996). Flavonoids, Coumarins, and Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship, *J.Agric. Food. Chem.*, 44(2), 497-500. <https://doi.org/10.1021/jf950378u>
- Gordon, I. (1994). *Functional Food, Food Design, Pharmafood*. New York: Champman and Hall.
- Haleagrahara N., Jackie T., Chakravarthi S., R. M. and K. A. (2010). Protective Effect of Etlingera elatior (torch ginger) Extract On Lead Acetate - Induced Hepatotoxicity In Rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 35(5): 663-671.
- Harborne, J. (1987). *Metode Fitokimia* (Cetakan IV). Bandung: ITB.
- Jackie, T., Haleagrahara, N., & Chakravarthi, S. (2011). Antioxidant Effects of Etlingera elatior Flower Extract Against Lead Acetate-Induced Pertubations in Free Radical Scavenging Enzymes and Lipid Peroxidation in Rats. *BMC Research Notes* 4, 67. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-67>
- Lachumy, S.T.J., S. Sasidharan, V. Sumathy, & Z. Zuraini. (2010). Pharmacological activity, phytochemical analysis and toxicity of methanol extract of Etlingera elatior (torch ginger) flowers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 3: 769-774. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60185-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60185-X)
- Jork, H., Funk, W., Fischer, W., Wimmer, H. (1990). *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods* (Volume 1a). Germany: VCH Publishing.
- Mikova K. (2001). *The Regulations of Antioxidant in Food*. CRC Press. Wood-head Publishing.
- Preethi, K, et al. (2010). In Vitro Activity of Extracts from Fruits of *M. calabura* Linn. From India, *Pharmacognosy Journal*, 2, 11-18.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. and Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavanoids*, Springer Verlag: Berlin
- Markham, K. R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- Maslarova, N. V. Y. (2001). *Inhibiting Oxidation*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Molyneux, P. (2004). The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technicol.*, 26(2), 211-219.
- Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce (IV) reducing capacity measurement (1)Diakses tanggal 18 Mei 2010. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.06.015>
- Masoko, P., dan Eloff, J.N. (2007). Screening of Twenty-four South African Combretum and Six Terminalia Species (Combretaceae) for Antioksidant Activities, *African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines*, 4 (2), 231-239.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M. (2001). *Antioxidant in Food: Practical Applications*. New

- York: CRC Press.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: ITB.
- Kumar S. (2010). *Extraction of Essential Oil Using Steam Distillation*. Rourkela: National Institute of Technology Press.
- Siddiqua, *et al.* (2010). Antioxidant Activity and Estimation of Total Phenolic Content of *M. calabura* L. by Colorimetry, *International Journal of ChemTech Research*, 2 (1), 205-208.
- Su, Bao Ning, *et al.* (2003). Activity Guided Isolation of The Chemical Constituents of *M. calabura*. L Using a Quinone Reductase Induction Assay. *Phytochemistry*, 63, 335-341.
- Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug Analysis*. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Zakaria, Z. A, *el al.* (2010). *In vitro* Antimicrobial Activity of *M. calabura* L. Extracts and fractions. *Internasional Journal of Pharmacology*, 4, 304-308.