

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak *N*-Heksan, Etil Asetat Dan Metanol Dari Varietas Umbi Wortel (*Daucus Carota* L.) Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

M.R. Ghozaly, E.B.Safitri

Fakultas Farmasi Institut Sains Dan Teknologi Nasional Jakarta,
Jl. Moh. Kahfi Ii, Bhumi Srengseng Indah, Jagakarsa, Jakarta Selatan 12640

ABSTRAK

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron (*electron donor*) kepada radikal bebas untuk menghambat reaksi oksidatif. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan adalah umbi wortel (*Daucus carota* L.). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari beberapa varietas wortel dan menggunakan variasi pelarut dalam pembuatan ekstrak. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Pembuatan ekstrak umbi wortel pada penelitian ini menggunakan metode maserasi bertingkat dari tingkat kepolaran pelarut non polar ke pelarut polar yaitu pelarut *n*-heksan, etil asetat dan metanol. Ekstrak yang telah diuapkan pelarutnya kemudian dilakukan skrining fitokimia, hasil skrining fitokimia ekstrak menunjukkan positif mengandung alkaloid, flavonoid, tanin dan antrakinon. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metoda DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm. Hasil uji aktivitas antioksidan pada varietas umbi wortel menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksan, etil asetat, dan metanol memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan nilai IC₅₀ berturut-turut pada wortel chantenay 108,437 µg/ml; 534,465 µg/ml; 517,93 µg/ml, pada wortel imperator 335,652 µg/ml; 309,15 µg/ml; 229,81 µg/ml, dan pada wortel nantes 560,6 µg/ml; 160,08 µg/ml; 488,98 µg/ml. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding memiliki IC₅₀ 11,61 µg/ml.

Kata Kunci : Antioksidan, DPPH, Umbi Wortel

ABSTRACT

Antioxidants are chemical compounds that can donate one or more electrons (*electron donor*) to the free radicals to inhibit oxidative reactions. One of the plants that has potential as an antioxidant is carrot root (*Daucus carota* L.). The purpose of this study was to determine the antioxidant activity of some varieties of carrots and use a variety of solvent in the manufacture of the extract. Testing of antioxidant activity using DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). Making the carrot root extract in this study using maceration method of rate-rise non-polar to polar solvent is a polar solvent *n*-hexane solvent, ethyl acetate and methanol. The extract was evaporated solvent is then conducted phytochemical screening, screening results showed positive phytochemical extracts contain alkaloids, flavonoids, tannins and anthraquinone. Measurement of antioxidant activity by DPPH method using spectrophotometer UV-Vis at a wavelength of 517 nm. Test results on the antioxidant activity showed that the varieties of carrot root extract *n*-hexane, ethyl acetate, and methanol have antioxidant activity with IC₅₀ values in a row of carrots chantenay 108.437µg/ml; 534.465 µg/ml 517.93 µg/ml, carrots imperator 335.652 µg/ml; 309.15 µg/ml; 229.81 µg/ml, and the nantes carrot 560.6 µg/ml; 160.08 µg/ml; 488.98 µg/ml. Vitamin C is used as a comparison have IC₅₀ 11.61 µg/ml.

Keywords: antioxidant, DPPH, Bulbs Carrot

PENDAHULUAN

Akhir-akhir ini dunia kesehatan banyak membahas tentang radikal bebas dan antioksidan (Widjaya, 1996). Radikal bebas adalah suatu senyawa atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan. Radikal bebas sangat berbahaya dikarenakan reaktivitasnya yang tinggi dapat mengakibatkan terbentuknya senyawa radikal baru. Antioksidan adalah suatu senyawa yang dapat memperlambat atau mencegah proses oksidasi dan merupakan senyawa pemberi elektron (elektron donor) atau reduktan (Winarsi, 2007). Keseimbangan antara radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh menjadi salah satu faktor yang dapat

mempengaruhi kesehatan pada manusia (Widjaya, 1996). Stres oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara oksidan dan antioksidan di dalam tubuh. Akibat dari stres oksidatif dapat menyebabkan penyakit seperti kanker, infark jantung, diabetes melitus dan lain-lain. Hal ini disebabkan karena sebagian manusia pada masa sekarang tidak mendapatkan asupan antioksidan yang cukup dari makanan yang dikonsumsi. Hal ini yang melatarbelakangi timbulnya berbagai macam penyakit seperti kanker, jantung koroner, diabetes mellitus, hati, dan penuaan dini (Widjaya, 1996).

Senyawa-senyawa yang mempunyai potensi sebagai antioksidan umumnya merupakan senyawa flavonoid, fenolat, dan alkaloid. Senyawa flavonoid dan

polifenolat bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik, dan antiinflamasi, sedangkan alkaloid mempunyai sifat antineoplastik yang juga ampuh menghambat pertumbuhan sel-sel kanker (Atta, 2001).

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan adalah umbi wortel. Telah diketahui bahwa tanaman wortel memiliki kandungan senyawa aktif yaitu protein, karbohidrat, lemak, serat, gula alamiah, pektin, glutatin, asparagin, beta karoten, geraniol, flavonoida, pinena dan limonena. Wortel ini juga kaya akan vitamin A, B kompleks, C, D, E, K, dan antioksidan (Sunanto, dkk., 2003). Di dalam wortel terdapat senyawa antioksidan alami berupa karotenoid dan provitamin A. Kandungan karotenoid dalam wortel dapat dilihat dari intensitas warnanya, yaitu semakin jingga warna wortel maka semakin banyak kandungan karotenoidnya (Ting Sun, et al, 2009). Wortel memiliki beberapa macam varietas, varietas-varietas tersebut dibagi dalam tiga kelompok yang didasarkan pada bentuk umbi yaitu tipe imperator, tipe chantenay dan tipe nantes (Cahyono, 2002).

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode. Pada penelitian ini diuji aktivitas antioksidan ekstrak varietas wortel dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode ekstraksi simplisia yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi bertingkat dengan peningkatan kepolaran pelarut, masing-masing pelarut yaitu n-heksan, etilasetat dan metanol. Kemudian masing-masing ekstrak kental dari varietas wortel, yaitu ekstrak n-heksan, etilasetat dan metanol diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH secara kuantitatif menggunakan alat spektrofotometer UV-Vis.

Kelebihan metode DPPH ini adalah mudah dan cepat, sedangkan kelemahan dari metode DPPH hanya dapat memberikan informasi mengenai aktivitas senyawa yang diuji dan hanya dapat mengukur senyawa anti radikal yang terlarut dalam pelarut organik khususnya alkohol (Utomo dkk, 2013). Nilai aktivitas antioksidan dinyatakan dengan IC_{50} yang merupakan konsentrasi antioksidan yang mampu menghambat 50% radikal (Sunarni, 2005).

METODOLOGI PENELITIAN

Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Penelitian Fitokimia di Fakultas Farmasi Institut Sains dan Teknologi Nasional, Jalan Moh. Kahfi II, Bhumi Srengseng Indah Jagakarsa, Jakarta Selatan. Waktu penelitian dilaksanakan pada Juni 2016 sampai Januari 2017.

Bahan dan Alat

Bahan: varietas umbi wortel (tipe imperator, chantenay dan nantes), pelarut n-heksan, etilasetat dan metanol, peraksi pada skrining, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), dan pembanding Vitamin C.

Alat: Spektrofotometer UV-Vis, rotavapor, alat untuk skrining dan inkubasi.

Sainstech Farma Vol. 9 No.2, Juli 2016

Ekstraksi Sampel

Varietas umbi wortel di potong kecil lalu di keringkan, dan di blander sehingga halus. Setelah halus di maserasi dengan menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda yaitu n-heksan, etilasetat dan metanol. Hasil dari maserasi dikumpulkan dan diuapkan dengan rotary evaporator (pada suhu $50^{\circ}C$) sehingga didapat ekstrak kental n-heksan, etilasetat dan metanol.

Penapisan Fitokimia

Identifikasi alkaloid, identifikasi flavonoid, identifikasi terpenoid, identifikasi tanin, identifikasi saponin dan identifikasi kuinon.

Uji Aktivitas Menggunakan Metode DPPH

Masing-masing 10mg ekstrak yang didapat dilarutkan dalam metanol 10ml. Masing-masing ekstrak tersebut ditotolkan pada lempeng silika gel dengan menggunakan pipa kapiler. Untuk menentukan bercak yang mempunyai aktifitas antioksidan, selanjutnya lempeng disemprot dengan larutan DPPH dalam metanol. Lempeng didiamkan beberapa menit, kemudian amati bercak yang muncul. Senyawa aktif penangkal radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu (Valentao et al, 2001).

a. Pembuatan larutan DPPH

Sejumlah 10 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml metanol p.a didapatkan konsentrasi 100 ppm (Isnindar dkk, 2011).

b. Pembuatan larutan blanko

Pembuatan Larutan blanko dilakukan dengan cara dipipet 1,0 ml metanol p.a dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1,0 ml larutan DPPH, lalu ditambahkan 2,0 ml metanol, kemudian dikocok sampai homogen. Selanjutnya larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu $37^{\circ}C$ (Isnindar dkk, 2011).

Optimasi panjang gelombang DPPH

Larutan DPPH dengan konsentrasi $100\mu g/mL$. Larutan DPPH disimpan dalam wadah yang dilindungi dari cahaya dengan cara melapisinya dengan kertas aluminium. Untuk setiap pengujian, larutan DPPH harus dibuat baru. Larutan ini ditentukan spektrum serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400 nm hingga 700 nm serta ditemukan panjang gelombang optimumnya.

c. Pembuatan larutan uji

Sebanyak 10 mg ekstrak ditimbang kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol p.a dengan konsentrasi $1000\mu l/ml$ sebagai larutan induk. Dari larutan induk $1000\mu g/ml$ dibuat larutan induk seri dengan konsentrasi $100\mu g/ml$, pipet 5 ml larutan induk $1000\mu g/ml$ larutkan dalam 50 metanol p.a. Diambil sebanyak 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 dan 5,0 ml larutan tersebut, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 10,0 ml, sehingga diperoleh konsentrasi larutan sebesar 10; 20; 30; 40 dan $50\mu g/ml$.

d. Pembuatan Lar. pembanding Vitamin C

Sebanyak 5 mg vitamin c ditimbang kemudian dilarutkan dalam 50 ml metanol p.a dengan konsentrasi $100\mu l/ml$. Diambil sebanyak 0,5; 1,0; 1,5

2,0; dan 2,5ml larutan tersebut, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 10,0 ml, sehingga diperoleh konsentrasi larutan sebesar 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 dan 25,0 µg/ml.

e. Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak

Masing-masing larutan uji dan larutan pembanding dipipet 1,0 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambah sebanyak 2,0 ml metanol p.a dan 1,0 ml DPPH, dikocok hingga homogen. Selanjutnya larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Isnindar dkk, 2011).

Perhitungan

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan Inhibition Concentration 50% (IC₅₀) yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing-masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus Valentao et al, 2001).

$$\% inh = \frac{Abs. Blanko - Abs. Sampel}{Abs. Blanko} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, dilanjutkan dengan perhitungan secara regresi linier menggunakan persamaan $y = A + Bx$, dimana x adalah konsentrasi (µg/ml) dan y adalah presentase inhibisi (%). Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan Inhibition Concentration 50% atau IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dapat merendam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y dengan 50.

HASIL PERCOBAAN DAN PEMBAHASAN

Prinsip dari metode DPPH adalah interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron

atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning terang dan absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 517 nm (Molyneux, 2004).

Persen inhibisi digunakan untuk menentukan persentase hambatan dari suatu bahan yang dilakukan terhadap senyawa radikal bebas. IC₅₀ didefinisikan sebagai jumlah antioksidan yang diperlukan untuk menurunkan konsentrasi DPPH sebesar 50% (Day et al, 1986).

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak dari varietas umbi wortel memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda. Pada wortel chantenay antioksidan yang paling tinggi adalah ekstrak n-heksan dengan IC₅₀ 108,437 µg/ml, setelah itu ekstrak metanol dan etil asetat dengan IC₅₀ berturut-turut 517,935 µg/ml dan 534,465 µg/ml. Pada wortel imperator antioksidan paling tinggi adalah ekstrak metanol dengan IC₅₀ 229,811 µg/ml, setelah itu ekstrak etil asetat dan n-heksan dengan IC₅₀ berturut-turut 309,148 µg/ml dan 335,652 µg/ml. Sedangkan pada wortel nantes antioksidan paling tinggi adalah ekstrak etil asetat dengan IC₅₀ 160,083 µg/ml, setelah itu ekstrak metanol dan n-heksan dengan IC₅₀ berturut-turut 488,982 µg/ml dan 560,606 µg/ml. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding memiliki nilai IC₅₀ 11,606 µg/ml. Data dapat dilihat pada Tabel 1.

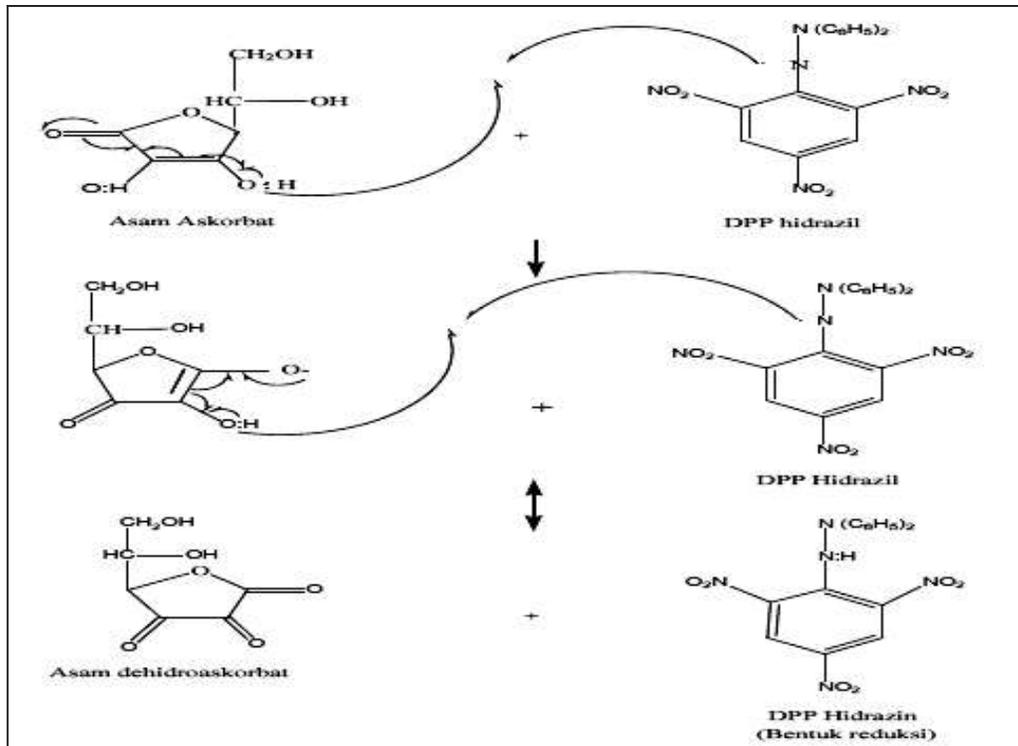
Hasil uji antioksidan dapat dilihat pada wortel chantenay antioksidan tertinggi terdapat pada ekstrak n-heksan dikarenakan senyawa antioksidan yang terdapat pada wortel chantenay terlarut lebih banyak pada pelarut n-heksan. Sedangkan pada wortel imperator antioksidan tertinggi pada ekstrak metanol karena senyawa antioksidan yang terdapat pada wortel imperator terlarut lebih besar pada pelarut metanol. Begitu pula pada wortel nantes antioksidan yang tertinggi terdapat pada ekstrak etil asetat karena senyawa antioksidan yang terlarut dalam wortel nantes lebih banyak pada pelarut etil asetat

Tabel 1. Nilai IC₅₀ Aktivitas Antioksidan

Jenis Wortel	Sampel Ekstrak	Konsentrasi	% Inhibisi	Persamaan Linier	IC ₅₀ (µg/ml)	
Wortel Chantenay	n-Heksan	30	0.568182	$y = 0.6345x - 18.75$ $R^2 = 0.997$	108,437	
		40	6.060606			
		50	13.25758			
	Etil Asetat	20	3.219697	$y = 0.091x + 1.3636$ $R^2 = 0.9965$	534,465	
		30	3.977273			
		40	5.113636			
	Metanol	50	5.871212	$y = 0.098x - 0.7576$ $R^2 = 0.9912$	517,935	
		10	0.378788			
		20	1.136364			
		30	1.893939			
	Wortel Imperator	n-Heksan	40	3.409091	$y = 0.1599x - 3.6708$ $R^2 = 0.9918$	335,652
			50	4.166667		
30			1.243339			
Etil Asetat		40	2.486679	$y = 0.158x + 1.1545$ $R^2 = 0.9812$	309,148	
		50	4.440497			
		10	2.131439			
		20	4.795737			
Metanol		30	6.394316	$y = 0.2487x - 7.223$ $R^2 = 0.979$	229,811	
		40	7.460036			
		50	8.703375			
Wortel Nantes		n-Heksan	30	0.53286	$y = 0.089x + 0.1066$ $R^2 = 0.9936$	560,606
			40	2.131439		
	50		5.506217			
	10		1.065719			
	20		1.776199			
	Etil Asetat	30	2.664298	$y = 0.2522x + 9.627$ $R^2 = 0.9778$	160,083	
		40	3.907638			
		50	4.440497			
		10	13.14387			
	Metanol	20	13.85435	$y = 0.1012x + 0.515$ $R^2 = 0.986$	488,982	
		30	16.69627			
		40	19.18295			
		50	23.09059			
		10	1.243339			
	Vitamin C		20	2.664298	$y = 3.125x + 13.73$ $R^2 = 0.9962$	11,606
30			3.907638			
40			4.618117			
50			5.328597			
5			31.62879			

Disini dapat dilihat mekanisme reaksi yang terjadi antara vitamin C dengan DPPH. Dimana vitamin C mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas karena mempunyai ikatan rangkap dan dengan adanya 2 gugus-OH yang terikat pada ikatan rangkap tersebut, radikal

bebas akan mencabut atom hidrogen dan menyebabkan muatan negatif pada atom oksigen yang selanjutnya akan didelokalisasi melalui resonansi, sehingga menghasilkan radikal bebas yang stabil dan tidak membahayakan (Cholishoh, 2008).



Gambar IV.1 Mekanisme reaksi antara Vitamin C dan DPPH^[14]

KESIMPULAN

1. Padawortel chantenay antioksidan yang paling tinggi adalah ekstrak n-heksan dengan IC_{50} 108,437 $\mu\text{g/ml}$, setelah itu ekstrak metanol dan etil asetat dengan IC_{50} berturut-turut 517,935 $\mu\text{g/ml}$ dan 534,465 $\mu\text{g/ml}$. Pada wortel imperator antioksidan paling tinggi adalah ekstrak metanol dengan IC_{50} 229,811 $\mu\text{g/ml}$, setelah itu ekstrak etil asetat dan n-heksan dengan IC_{50} berturut-turut 309,148 $\mu\text{g/ml}$ dan 335,652 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada wortel nantes antioksidan paling tinggi adalah ekstrak etil asetat dengan IC_{50} 160,083 $\mu\text{g/ml}$, setelah itu ekstrak metanol dan n-heksan dengan IC_{50} berturut-turut 488,982 $\mu\text{g/ml}$ dan 560,66 $\mu\text{g/ml}$. Vitamin C yang digunakan sebagai pembanding memiliki nilai IC_{50} 11,606 $\mu\text{g/ml}$. Nilai IC_{50} tersebut menunjukkan ekstrak umbi wortel tergolong antioksidan lemah.
2. Varietas umbi wortel yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi terdapat pada wortel tipe chantenay, sedangkan yang paling rendah pada wortel tipe imperator.

DAFTAR PUSTAKA

- Atta ur-Rahman, M.I. Choudhary. Bioactive Natural Products a Potential of Pharmacophores, A Theory of Memory. *Pure Appl.*2001. Hal. 555-560.
- Cahyono, Bambang. Wortel Teknik Budi Daya Analisis Usah Tani. *Kanisius, Yogyakarta.* 2002.
- Cholisoh, Z. Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Ethanol 70% Biji Jengkol (*Archidendron jiringa*). *Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.*2008.9 (1). Hal. 33-40.
- Day, R. A, dan Underwood A. L. Analisis Kimia Kuantitatif. 5th ed. *Penerbit Erlangga.* Jakarta.1986.
- Harmita, Hayun, Hariyanto, Herman S., Nelly D.L., Sabarijah W., Umar M. Analisis Kuantitatif Bahan Baku & Sediaan Farmasi. 1th ed, *Departemen Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.* Jakarta. 2006. Hal. 134-140.

- Isnindar, Setyowati, E.R., dan Wahyuono, S. Aktivitas Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki* L.F) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1 Pikrilhidrazin). *Media Farmasi Indonesia*. Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Farmasi dan Keperawatan Universitas Tanjungpura. Pontianak. *Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM. Jogjakarta*. 2011. Hal 114
- Molyneux, P. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) For estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarín, J.Sci. Technol*. 2004. 26(2). Hal. 211-219.
- Sunarni, T. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae., *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2005. 2(2). Hal.53-61.
- Sunanto, Suryani, N. Razak dan D. Suryanto. Pemanfaatan Lahan Dataran Rendah Dengan Sayuran Organik. *Laporan Hasil Pengkajian. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Sulawesi Selatan*. 2003.
- Ting Sun, Philip W., Simon and Sherry A., Tanumiharjo. Antioxidant Phytochemicals and Antioxidant Capacity of Biofortified Carrots (*Daucus carota* L.) of Various Colours. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 2009. 57 (10). 4142-4147.
- Utomo, A.R., Retnowati, R., Guswono, U.P. Pengaruh Konsentrasi Minyak Kenanga (*Cananga odorata*) Terhadap Aktivasnya Sebagai Anti Radikal Bebas. *Kimia Student Journal*. 2013. 1(2). Hal. 265.
- Valentao, P., E. Fernandes, F. Carvalho, P. B. Andrade, R. M.Seabra, M. L. Bastos. Antioxidant Activity Of Centarium Erythraea Infusion Evidenced By Its Superoxide Radical Scavenging and Xanthine Oxidase Inhibitory Activity, *J. Agric. Food Chem*. 2001. Vol. 49. Hal. 3476-3479.
- Widjaya, A. Radikal Bebas dan Parameter Status Antioksidan. *Forum Diagnosticum*. 1996. Vol. 4. Hal. 1-6.
- Winarsi, H. Antioksidan Alami & Radikal Bebas. *Kanisius. Yogyakarta*. 2007. Hal 12-21.