

## THE EFFECTIVENESS OF SOLVENT PROPORTIONS ON ANTIOXIDANT PROPERTIES OF WANGON (*Olax psittacorum* (Wild.) Vahl.) LEAVES

Reslely Harjanti<sup>\*</sup>, Siti Aisyah, Vivin Nopiyanti

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi

\*email: reslely.nindy@gmail.com

### Abstract

*The aim of this research was to find out the proportion of food grade and effective ethanol solvent to extract antioxidant phytoconstituents in wangon leaves. This study used 50%, 70% and 96% ethanol solvent. Wangon leaves were extracted with soxhlet method to produce the corresponding extract. Then the extract was tested for its antioxidant activity and the levels of the compound suspected to be active as an antioxidant compound including flavonoids and phenolic total were determined. The results showed that the best solvent proportion for extracting wangon leaves to have the greatest antioxidant activity was 96% ethanol. It was proved that 96% ethanol extract has potency as antioxidant with  $IC_{50}$  value equal to 71,27 ppm better than 50% and 70% ethanol extract. The 96% ethanol extract also had the greatest flavonoid and phenolic content of  $99.44 \pm 1.27$  mg Quercelia equivalent (QE)/g samples and  $121.66 \pm 1.39$  mg Gallic acid equivalent (GAE)/g samples. The content of flavonoid and phenolic phytoconstituents in the extract has a linear correlation and was strongly associated with its antioxidant activity.*

**Keywords:** Antioxidant, DPPH, Ethanol, Solvent Proportions, Wangon leaves

### PENDAHULUAN

Wangon (*Olax psittacorum* (Wild.) Vahl.) banyak tumbuh di daerah hutan jati di hampir sebagian besar wilayah Indonesia. Jaman dahulu bahkan sampai sekarang sebagian besar penduduk lokal memanfaatkan daunnya sebagai bahan pangan terutama pada saat musim paceklik. Daun wangon dikonsumsi dengan cara dibuat urapan atau lalapan. Menurut laporan hasil penelitian di India, daun wangon mengandung senyawa antara lain fenolik khususnya flavonoid serta tanin (Majumder dkk, 2015). Fitokonstituen tersebut umumnya dikaitkan dengan aktivitas antioksidan (Yalla dkk, 2010).

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat mencegah sel dari kerusakan yang disebabkan oleh molekul yang tidak

stabil yang dikenal sebagai radikal bebas (Deena dkk, 2011). Radikal bebas dapat menyebabkan kondisi patologi yaitu menyebabkan kerusakan oksidasi pada lipid, protein, dan asam nukleat. Antioksidan sintetik seperti BHA, BHT, TBHQ dan propil galat dapat menyebabkan atau meningkatkan efek negatif bagi kesehatan (Pourmorad dkk, 2006; Karori dkk, 2007).

Senyawa fenolik merupakan senyawa penyusun yang keberadaannya luas dalam tanaman dan telah dipercaya mempunyai kapasitas antioksidan dan penangkap radikal bebas yang tinggi (Kahkonen dkk, 2001). Flavonoid mampu menghambat autooksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal bebas (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron dari elektron yang tidak

berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas berkurang (Pokorny dkk, 2001).

Aktivitas antioksidan senyawa dapat diukur dari kemampuannya menangkap radikal bebas. Senyawa-senyawa yang tergabung dalam antioksidan ini akan menyerahkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga menjadi bentuk molekul yang normal kembali dan menghentikan berbagai kerusakan yang ditimbulkan (Caroline, 2005). Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (2,2- difenil-2-pikrilhidrazil). Senyawa DPPH adalah radikal yang distabilkan oleh delokalisasi elektron bebas secara menyeluruh dan menyebabkan DPPH tidak mudah membentuk dimer. Pencampuran radikal DPPH dengan substansi yang mampu menyumbangkan sebuah atom hidrogen akan memunculkan bentuk tereduksi yang ditunjukkan oleh perubahan warna ungu menjadi kuning. Perubahan ini dapat diukur secara spektrofotometri (Molyneux, 2004).

Saat ini perhatian banyak ditingkatkan dalam pencarian untuk mendapatkan sumber antioksidan alami yang lebih aman dan diharapkan dapat menjadi alternatif pengganti bagi antioksidan sintetis, karenanya penggalan informasi terkait kandungan fitokonstituen daun wangon serta kajian ilmiahnya diharapkan mampu menambah koleksi sumber antioksidan alami di Indonesia.

Kandungan fitokonstituen dalam daun wangon yang potensial sebagai antioksidan berdasarkan penelitian Majumder (2015) diperoleh dengan ekstraksi (penyarian) menggunakan pelarut metanol yang toksik. Sehingga dalam pengembangannya akan sulit untuk diaplikasikan menjadi berbagai produk baik terkait dengan bahan pangan maupun sediaan farmasi. Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi fitokonstituen antioksidan dengan pelarut yang *food grade* sehingga menjamin keamanannya. Selain itu diperlukan juga penelitian

dengan tujuan untuk mencari efektivitas proporsi pelarut karena selain metode ekstraksi, pelarut dan proporsinya juga menentukan kualitas dan kuantitas ekstrak yang diperoleh.

## METODE PENELITIAN

### a. Determinasi Tanaman Wangon

Determinasi tanaman harus dilaksanakan karena bertujuan untuk menetapkan kebenaran tanaman yang diteliti.

### b. Pengambilan Sampel dan Pembuatan Serbuk Daun Wangon

Daun wangon diambil dari wilayah hutan daerah Ngawi dan sekitarnya. Daun yang dipetik adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua dan masih segar dan bebas dari penyakit. Daun dicuci dan dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C. Pembuatan serbuk menggunakan alat penyerbuk lalu diayak dengan ayakan ukuran 60 Mesh. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering disimpan dalam wadah kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk penelitian.

### c. Pembuatan ekstrak daun wangon dengan metode soxhletasi

Serbuk kering daun wangon di soxhletasi dengan menggunakan pelarut etanol 50%, 70% dan 96%.

### d. Identifikasi Kandungan kimia ekstrak daun wangon

Identifikasi dilakukan terhadap kandungan flavonoid, fenolik, saponin dan tanin dalam masing-masing ekstrak dengan reaksi kimia.

### e. Penyiapan larutan untuk uji aktivitas antioksidan

**Larutan DPPH.** Larutan pereaksi adalah larutan DPPH 0,4 mM dalam pelarut etanol.

**Larutan uji.** Dibuat larutan induk ekstrak etanol daun wangon dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dibuat 5 seri konsentrasi. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu

ditetapkan *operating time* dari masing-masing larutan uji untuk mengetahui reaksi terhadap DPPH sudah berjalan stabil pada waktu yang diharapkan.

#### **Pengujian Aktivitas Antioksidan**

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 50%, 70% dan 96% daun wangen dapat diidentifikasi dengan uji Kromatografi lapis tipis (KLT). Sampel ditotolkan di atas lempeng KLT silika gel GF 254 kemudian dieluasi dengan fase gerak n-heksana:etil asetat = 1:4. Setelah itu lempeng dikeringkan dan disemprot dengan larutan DPPH 0,2%. Kemampuan ekstrak dalam meredam radikal DPPH ditunjukkan dengan bercak warna kuning dan latar belakang ungu. Analisis kuantitatif antioksidan pengujian aktivitas antioksidan dimulai dengan tahapan penetapan kondisi analisis yaitu dengan penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) maksimum dan penetapan *operating time*. Selanjutnya aktivitas antioksidan ekstrak etanol 50%, 70% dan 96% hasil ekstraksi soxhletasi ditentukan dengan metode DPPH dengan cara : sebanyak 1,0 mL ekstrak dengan berbagai konsentrasi ditambah dengan 1,0 mL DPPH 0,4 mM. Campuran divorteks dan dibiarkan selama 30 menit. Larutan diukur serapannya pada panjang gelombangnya terhadap blanko ekstrak dan pelarut etanol p.a. Pengukuran serapan terhadap kontrol terdiri dari 1,0 mL DPPH dan 4,0 mL pelarut etanol p.a. Sebagai pembandingan digunakan kuersetin yang dibuat dengan berbagai konsentrasi.

Pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Serapan yang diperoleh selanjutnya digunakan pada pengukuran aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Nilai  $IC_{50}$  diperoleh dari suatu sampel persamaan regresi linear yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak uji dengan persen penangkapan radikal bebas.

#### **f. Penetapan kadar flavonoid total**

##### **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum.**

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL, ditambah dengan 1 mL  $AlCl_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Dilakukan pembacaan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 350-450 nm (Das dkk, 2013).

##### **Penentuan *Operating Time*.**

Larutan kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL  $AlCl_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Larutan tersebut diukur serapannya pada panjang gelombang yang telah diperoleh dengan interval pada waktu 2 menit sampai diperoleh serapan yang stabil.

##### **Penentuan Kurva Baku Kuersetin.**

Larutan standar dibuat dengan menggunakan kuersetin sebagai baku standar dan dibuat 5 seri konsentrasi. Sebanyak 1 mL larutan seri kadar dari masing-masing konsentrasi dimasukkan, direaksikan dengan 1 mL  $AlCl_3$  10% dan 8 mL asam asetat 5%. Didiamkan selama 16 menit pembacaan serapan seri konsentrasi dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

##### **Penentuan Flavonoid Total.**

Kandungan flavonoid total merujuk pada prosedur Chang et al., (2002) yang dimodifikasi dengan beberapa konsentrasi menggunakan kuersetin sebagai standar. Ditimbang ekstrak daun wangen sebanyak 25 mg dan dilarutkan dalam 25 mL etanol. Dari larutan stok dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 100 mL dengan etanol. Kemudian dipipet 1 mL dan ditambahkan 3 mL etanol, 0,2 mL  $AlCl_3$ , 0,2 mL kalium asetat 1 M, dan 5,6 mL aquabidestillata. Setelah itu diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimal dengan spektrofotometer UV-Visible

**g. Penetapan kadar fenolik total**

**Penentuan Panjang Gelombang Maksimal.** Larutan asam galat 100 ppm diambil sebanyak 1,0 mL kemudian ditambah dengan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan 4 mL natrium karbonat 1 M. Kemudian serapannya dibaca pada panjang gelombang 600-800 nm.

**Penentuan Operating Time.** Larutan asam galat 100 ppm diambil sebanyak 1,0 mL ditambahkan dengan reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan 4 mL natrium karbonat 1 M. Kemudian dibaca serapan larutan setiap 5 menit dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimal selama 60 menit.

**Penentuan Kurva Baku Asam Galat.** Larutan asam galat dibuat 5 seri konsentrasi kemudian diambil masing-masing sebanyak 1,0 mL ditambahkan dengan reagen Folin Ciocalteu sebanyak 2 mL, selanjutnya ditambahkan dengan 4 mL natrium karbonat 1 M. Diamkan selama *operating time* kemudian dibaca serapannya pada panjang gelombang maksimal. **Penentuan Fenolik Total.** Sampel ekstrak ditimbang 100 mg kemudian ditambah dengan 1,0 mL etanol dan 2,5 mL aquadestillata serta 2,5 mL reagen Folin Ciocalteu 50%. Campuran didiamkan selama 5 menit kemudian ditambah dengan 2 mL  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  7,5% dan divorteks selanjutnya diinkubasi selama *operating time* pada suhu 45°C. Kemudian dibuat regresi linier kurva kalibrasi standar dan kadar fenolik total dapat dihitung dengan memploting dalam persamaan regresi linier dan dihitung dengan menggunakan rumus :

$$TPC = \frac{C.V.fp}{w}$$

Keterangan :

TPC = kadar fenolik total

C = konsentrasi fenolik (nilai x dari hasil regresi)

V = Volume ekstrak (mL)

Fp = faktor pengenceran

W = berat sampel (g)

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Hasil determinasi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan untuk penelitian adalah (*Olex psittacorum* (Wild.) Vahl.). Diperoleh hasil rendemen ekstrak etanol 50% daun wangen adalah 24,35% sedangkan rendemen ekstrak 70% adalah 24,04% dan ekstrak etanol 96% adalah 33,28%. Rendemen ekstrak yang diperoleh menunjukkan efektivitas penyarian, meskipun tidak selalu berkorelasi positif terhadap kualitas kandungan senyawa aktif yang tersari dalam ekstrak tersebut.

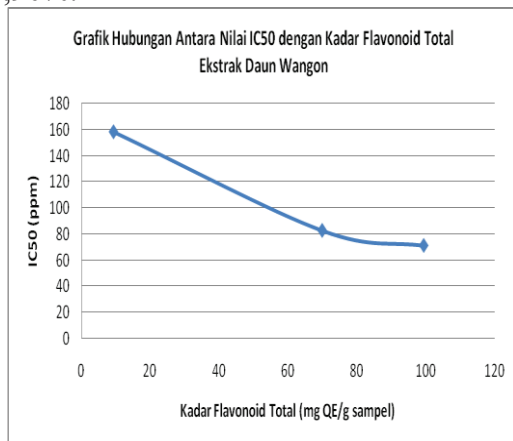
Identifikasi terhadap kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak daun wangen bertujuan untuk mengetahui fitokonstituen yang berpotensi sebagai antioksidan. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa ekstrak 50%, 70% dan 96% ekstrak etanol daun wangen mengandung flavonoid, fenolik, saponin dan tanin

Kemampuan kualitatif ekstrak daun wangen dalam meredam radikal DPPH ditunjukkan dengan bercak warna kuning dan latar belakang ungu pada lempeng KLT. Sedangkan uji kuantitatif seberapa besar kemampuan masing-masing ekstrak dalam meredam radikal DPPH digunakan metode spektrofotometri UV-Visibel. Setelah diperoleh persen aktivitas peredaman ekstrak dan standar kuersetin terhadap DPPH kemudian ditentukan aktivitas antioksidannya dengan cara menentukan nilai  $\text{IC}_{50}$  masing-masing. Dibuat persamaan regresi linier dari seri konsentrasi masing-masing larutan standar kuersetin dan sampel dengan aktivitas antioksidannya.

Aktivitas antioksidan dalam beberapa penelitian sebelumnya dilaporkan terkait dengan beberapa kandungan senyawa

kimia diantaranya adalah flavonoid dan fenolik. Sehingga dalam penelitian ini ditentukan juga kadar flavonoid total dan fenolik totalnya yang dapat dikorelasikan dengan kemampuan dalam meredam aktivitas radikal DPPH.

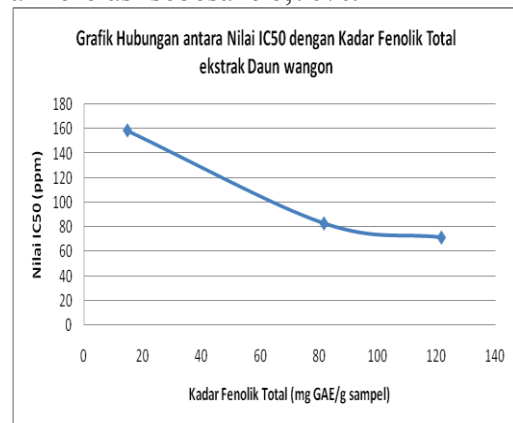
Penentuan konsentrasi flavonoid dari ekstrak etanol 50%, 70% dan 96% daun wangon dilakukan dengan metode kolorimetri  $AlCl_3$ . Metode ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah flavonoid golongan flavon dan flavonol. Prinsip penetapan flavonoid dengan metode kolorimetri  $AlCl_3$  adalah terbentuknya kompleks antara  $AlCl_3$  dengan gugus keto pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-4 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Pada pembuatan kurva kalibrasi digunakan kuersetin sebagai pembanding di mana kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Kadar flavonoid total ekstrak etanol 50% adalah  $9,38 \pm 0,30$  mg QE/g sampel sedangkan dalam ekstrak 70% adalah  $69,95 \pm 0,90$  mg QE/g sampel dan pada ekstrak etanol 96% adalah  $99,44 \pm 1,27$  mg QE/g sampel. Jika dikorelasikan antara aktivitas antioksidan dengan kadar flavonoid total, maka aktivitas antioksidan berbanding lurus dengan kadar flavonoid total dalam ekstrak tersebut dengan nilai korelasi sebesar 97,90%.



**Gambar 1. Grafik Hubungan antara Nilai IC50 dengan Kadar Flavonoid Total ekstrak Daun wangon**

Kadar fenolik total dalam ekstrak etanol 50% daun wangon adalah  $14,73 \pm 1,28$  mg GAE/g sampel untuk ekstrak 70% daun wangon adalah  $81,67 \pm 1,05$  mg GAE/g sampel dan ekstrak etanol 96% daun wangon adalah  $121,66 \pm 1,39$  mg GAE/g sampel. Kandungan total fenolik ekuivalen dengan asam galat sebagai standarnya dan disebut *Gallic Acid Equivalent* (GAE). Menurut Mongkolsilp (2004), GAE adalah acuan umum untuk menentukan berapa banyak senyawa fenolik yang terdapat di dalam suatu bahan. Dari perhitungan diperoleh hasil bahwa ekstrak etanol 96% mempunyai GAE yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% dan 50%.

Jika dikorelasikan antara aktivitas antioksidan antara kedua ekstrak etanol daun wangon, maka dapat ditunjukkan bahwa aktivitas antioksidan berkaitan dengan kadar fenolik total yang terkandung dalam ekstrak tersebut dengan nilai korelasi sebesar 96,70%.



**Gambar 2. Grafik Hubungan antara Nilai IC50 dengan Kadar Fenolik Total ekstrak Daun wangon**

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa proporsi pelarut yang paling baik untuk mengekstraksi daun wangon supaya mempunyai aktivitas antioksidan terbesar



adalah dengan etanol 96%. Hal ini dibuktikan bahwa ekstrak etanol 96% menunjukkan aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  71,27 ppm, sedangkan ekstrak 70% mempunyai nilai  $IC_{50}$  82,77 ppm dan ekstrak 50% nilai  $IC_{50}$  158,48 ppm. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  menunjukkan aktivitas antioksidan yang semakin besar.

Ekstrak etanol 96% juga mempunyai kandungan flavonoid dan fenolik total terbesar jika dibandingkan dengan ekstrak etanol 50% dan 70%, di mana fitokonstituen tersebut disinyalir berperan kuat dalam aktivitas antioksidan ekstrak daun wangen. Kadar flavonoid total ekstrak etanol 50% adalah  $9,38 \pm 0,30$  mg QE/g sampel sedangkan dalam ekstrak 70% adalah  $69,95 \pm 0,90$  mg QE/g sampel dan pada ekstrak etanol 96% adalah  $99,44 \pm 1,27$  mg QE/g sampel. Sedangkan kadar fenolik total dalam ekstrak etanol 50% daun wangen adalah  $14,73 \pm 1,28$  mg GAE/g sampel untuk ekstrak 70% daun wangen adalah  $81,67 \pm 1,05$  mg GAE/g sampel dan ekstrak etanol 96% daun wangen adalah  $121,66 \pm 1,39$  mg GAE/g sampel. Kadar flavonoid dan fenolik total dalam ekstrak daun wangen mempunyai korelasi linier (berbanding lurus) dan kuat terhadap aktivitas antioksidannya.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih peneliti sampaikan kepada Universitas Setia Budi yang telah membiayai penelitian ini pada skema Penelitian Dasar tahun pendanaan 2017.

Majumder, R. Dhara, M., Adhikari, L. 2015, Comparative Study of Leaves and Stem Methanolic Extract on Antioxidant and Antimicrobial Activity through Quantitative Evaluation of Phytoconstituents, *International Journal of Engineering Technology, Management and Applied Sciences*. Vol.3, 208-216.

Molyneux, P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant

#### DAFTAR PUSTAKA

- Caroline, 2005, Uji Aktivitas Antioksidan Antiradikal Bebas dan Penentuan  $IC_{50}$  dari Daun Cincau Hijau (*Cycla barbata Miers*), *Jurnal Obat Bahan Alam*, Vol 4, 11, 12, 14.
- Das, N., Md. E. Islam., N. Jahan., M. S. Islam., A. Khan, Md. R. Islam, & Mst. S. Parvin, 2014, Antioxidant Activities of Ethanol Extracts and Fractions of *Crescentia cujete* Leaves and Stembark and The Involvement of Phenolic Compounds. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.14-45
- Deena D. M., Lakshmil M.S.,Kumar.S.A.,Kumar.A.G.,Basha .J.D.,and Naganjaneyulu. R., 2011, Antioxidant Activity of *Sophora interrupta* Bedd, *International Journal of Phytopharmacology.*, 43-47.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuoreia, H. J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., and Heinonen M., 2001, Antioxidant Activity of Extract Containing Phenolic Compounds, *J. Agric.FoodChem.*, 47, 3954-3962.
- Karori, S.M., Wachira. F.N., Wanyoko, J.K., and Ngure, R.M., 2007, Antioxidant Capacity of *Orthosiphon stamineus* Benth from Different Geographical Origin, *Journal of Sustainability Science and Management*, Vol. 1(2): 14-20.
- Activity, Songklanakarin *Journal of ScienceTechnology*,2004, 26 (2) : 211-219.
- Pokorny, J., Yanishelvia, N., and Gordon, M., 2001, *Antioxidant in Food, Praticial Aplications*, CRC Press, New York, 1-73, 87-119, 147-155.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N., 2006, Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Content some Selected Iranian MedicinalPlants, *African Journal of*

- Biotechnology*, Vol. 5 (11), pp. 1142-1145.
- Mongkolsilp, S., Pongbupakit, I., Sae-lee, N., Sitthithaworn, W., 2004, Radical Scavenging activity and total phenolic content of medical plants used in primary health care. *Jurnal of Pharmacy and Science*. 9(1) :32-35
- Yalla, R. K., Kumar S., Lakshmi M., and Angothu S., 2010, Antioxidant Properties of Methanolic Extract Of *Oxalis Corniculata*, *International Journal of Phytopharmacology*., 43-46.