



Artikel Penelitian

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI HASIL FRAKSINASI DAUN NYAMPLUNG (*CALOPHYLLUM INOPHYLLUM*) DENGAN METODE DPPH (1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL)

ANTIOXIDANT ACTIVITY TEST FROM THE RESULTS OF NYAMPLUNG LEAF (*CALOPHYLLUM INOPHYLLUM*) FRACTIONATION WITH DPPH METHOD (1,1-DIPHENYL-2-PICRYLHYDRAZIL)

Andika Indra Purwanto^a, Afghani Jayuska^b, In'am Ilmiawan^b

^aMahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sumatera Utara, Jl. STM No. 77, Medan, Indonesia

^bDosen FK Universitas Tanjungpura, Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi, Pontianak, Indonesia

Histori Artikel

Diterima:
11 Mei 2021
Revisi:
27 Mei 2021
Terbit:
1 Desember 2021

Kata Kunci

Antioksidan,
Fraksinasi, Daun
Nyamplung, DPPH

Korespondensi

Telp.082252317499
Email:
andikaip@gmail.com

ABSTRAK

Radikal bebas adalah senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan. Radikal bebas yang tinggi dapat mengakibatkan stress oksidatif yang akan memicu munculnya berbagai penyakit. Tubuh membutuhkan antioksidan yang dapat memproteksi tubuh dari radikal bebas. Studi literatur menunjukkan bahwa daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) mengandung senyawa metabolit yang memiliki efek antioksidan. Penelitian ini bertujuan menguji aktivitas antioksidan dari hasil fraksinasi daun nyamplung. Simplicia daun nyamplung dipartisi secara sokletasi bertingkat menggunakan pelarut metanol, n-heksan dan etil asetat menghasilkan ekstrak total, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi metanol. Kemudian diuji antioksidan secara kualitatif maupun kuantitatif. Dari hasil uji kualitatif ditemukan hasil bahwa larutan uji dapat meredam radikal bebas DPPH ditandai dengan perubahan warnalarutan DPPH dari ungu menjadi kekuningan. Hasil uji secara kuantitatif didapatkan bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak total 12.65 ppm, fraksi n-heksan 46.44 ppm, fraksi etil asetat 4.62 ppm dan fraksi metanol 53.19 ppm. Daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dan kuat yaitu ekstrak total dan fraksi etil asetat dengan aktivitas antioksidan sangat kuat, serta fraksi n-heksan dan fraksi metanol dengan aktivitas antioksidan kuat.

ABSTRACT

*A free radical is an atom that has an unpaired electron. The free radicals can trigger the various diseases caused by oxidative stress. The body needs antioxidant which can protect the body from the free radicals. Literature studies explained nyamplung leaves (*Calophyllum inophyllum*) contain chemical compounds which have an antioxidant effect. Objectives: The aim of research was to test the antioxidant activity from nyamplung leaves fractionation Results. Methods: Nyamplung leaves simplicia partitied with leveled soxhletation with methanol, n-hexane, and ethyl-acetate which outcomes were the total extract, methanol, n-hexane and ethyl-acetate fraction. They were tested with quantitative and qualitative test. Results : the test solvents can inhibit the DPPH's free radicals which was marked by the degradation of DPPH solvent from purple to yellow. In the quantitative test, the result indicates that IC₅₀ value from total extract was 12.65 ppm, n-hexane fraction was 46.44 ppm and ethyl-acetate was 4.62 ppm was a fraction, and methanol fraction was 53.19 ppm. The research outcomes : the fractionation of *Calophyllum inophyllum* L. Leaves have strong to very strong antioxidant activity: Total extract and ethyl-acetate fraction with very strong activity, n-hexane fraction and methanol fraction with strong activity.*

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah atom atau kelompok atom yang memiliki elektron tidak berpasangan. Keberadaan elektron tidak berpasangan dalam suatu senyawa mengakibatkan senyawa tersebut bersifat sangat reaktif untuk mengikat elektron lain di sekelilingnya.¹ Peningkatan elektron tidak berpasangan yang tinggi memiliki dampak negatif pada tubuh dengan menyebabkan stress oksidatif yang dapat memicu berbagai penyakit.²

Oxidative Stress (Stress Oksidatif) ialah kondisi ketika kadar radikal bebas melampaui kemampuan tubuh untuk menyeimbangkannya. Stress oksidatif mengakibatkan intensitas proses oksidasi sel - sel tubuh normal menjadi semakin tinggi dan menimbulkan kerusakan yang lebih banyak.¹ Stress oksidatif mempunyai peran besar dalam perkembangan penyakit degeneratif dan kronik seperti kanker, kelainan autoimun, penuaan, katarak, rematoid arthritis, penyakit kardiovaskular dan penyakit neurodegeneratif.² Saat ini penyakit degeneratif telah menjadi penyebab kematian tertinggi di dunia. Tahun 2016 kasus kematian akibat penyakit degeneratif di dunia sejumlah 987.122.278 jiwa. Oleh karena itu, tubuh membutuhkan antioksidan untuk memproteksi tubuh dari serangan radikal bebas.

Antioksidan merupakan molekul yang dapat meredam reaksi oksidasi dengan cara mengikat molekul yang sangat reaktif dengan radikal bebas.³ Antioksidan berdasarkan sumbernya dapat dibedakan menjadi antioksidan sintetik dan alami. Antioksidan alami digolongkan menjadi enzim dan vitamin. Antioksidan berupa enzim yang dihasilkan oleh tubuh berupa *superoxide dismutase* (SOD), *glutathion peroxidase*, dan *katalase*. Sedangkan antioksidan alami seperti vitamin dihasilkan dari bahan alam bisa didapat dari buah dan sayur, misalnya vitamin A, C, dan E. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan pada umumnya adalah senyawa *fenol*.³ Antioksidan sintetik banyak digunakan dalam campuran produk makanan. Senyawa ini dapat berasal dari derivat antioksidan alami (misalnya *analog alfatokoferol*), antioksidan golongan *fenol* (misalnya *butylated hydroxytoluen* dan *butylated hydroxyanisole*), dan senyawa yang mengandung gugus *sulphidril* (misalnya *thiazolidin*, *ebsele*n, dan *dithiolethion*).⁴

Produksi antioksidan yang terjadi secara alami didalam tubuh untuk mengkondisikan kadar radikal bebas dalam keadaan seimbang didalam tubuh. Antioksidan berfungsi sebagai sistem proteksi terhadap tingginya senyawa radikal dengan elektron tidak berpasangan didalam tubuh. Akan tetapi senyawa radikal dapat

mengalami peningkatan karena faktor-faktor tertentu, seperti radiasi sinar UV, faktor stress, polusi, menurunnya sistem imun. Oleh karena itu diperlukan tambahan antioksidan dari luar tubuh (antioksidan eksogen). Antioksidan eksogen dapat ditemukan dengan wujud alami dan sintesis. Antioksidan sintesis seperti *buthylated hidrokisianisol (BHA)*, *buthylatedhydroxytoluene (BHT)*, dan *tert-butylhydroquinone (TBHQ)* dapat menghambat oksidasi secara efektif.⁴

Penggunaan antioksidan dari bahan alam menjadi motivasi dilaksanakannya penelitian lebih lanjut, setelah senyawa-senyawa sintesis yang digunakan sebagai antioksidan seperti *buthylated hidrokisianisol (BHA)*, *buthylated hydroxytoluene (BHT)*, dan *tert-butylhydroquinone (TBHQ)* dibatasi karena bersifat karsinogenik bila digunakan dalam jangka panjang.⁴ Berbagai penelitian mengenai berbagai antioksidan sintetik sebagai contohnya ialah BHT dan BHA membuktikan bahwa pada hewan coba, molekul ini dapat memicu tumbuhnya massa berupa tumor dan kanker dalam penggunaan jangka panjang. Dampak penggunaan jangka panjang dari antioksidan sintetik yaitu *hepatomegali*, dengan mempengaruhi aktivitas enzim di hati serta sifatnya yang *karsinogenik*, menimbulkan motivasi penelitian untuk

menjadikan antioksidan alami sebagai alternatif antioksidan tersebut.⁴

Tumbuhan nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) adalah salah satu dari tumbuhan tropis dengan kandungan antioksidan *polifenol* yang tinggi. Penggunaan nyamplung secara tradisional diantaranya adalah penggunaan daunnya sebagai obat berbagai kelainan kulit, seperti *erupsi*, *ulkus* dan luka. Selain itu, daun keringnya digunakan untuk reumatik dan *infus* daunnya digunakan untuk disentri dan sakit mata. Penggunaan medis *Calophyllum inophyllum* sebagai antimikroba, antioksidan, *anti dislipidemia*, *analgesik*, *larvisida*, *HIV₁-integrase*, dan enzim *reverse-transcriptase inhibitor* dan *protease*.⁵

Pada penelitian sebelumnya, aktivitas antioksidan daun *Calophyllum inophyllum* diketahui masih terbatas pada pengujian tingkat ekstrak total metanol. Diketahui bahwa jumlah kandungan *fenol* dari ekstrak total metanol dari *Calophyllum inophyllum* berturut-turut sebesar $97 \pm 9,2$ dan $140,28 \pm 17,1$ mg/g. Diketahui bahwa jumlah kandungan flavonoid dari larutan dan ekstrak metanol dari *Calophyllum inophyllum* berturut-turut sebesar $88,94 \pm 2,94$ dan $177,06 \pm 5,29$ mg/g.⁵ Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa nilai reaksi antioksidan daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) masih terbatas pada uji terhadap ekstrak total metanol saja.

Pengkajian yang lebih mendalam mengenai penilaian uji reaksi antioksidan dari hasil fraksinasi belum dilakukan. Maka dari itu perlu adanya pengkajian lebih mendalam mengenai uji reaksi antioksidan dari hasil fraksinasi daun nyamplung dalam berbagai tingkat kepolaran larutan.

METODE

Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) yang digunakan sebagai sampel diperoleh dari daerah pesisir pantai di daerah Kota Singkawang.

Pembuatan Fraksinasi

Metode pembuatan fraksinasi dilakukan dengan metode sokletasi bertingkat. Simplisia sebanyak 40 gram dibungkus kertas saring, ikat dengan benang, kemudian diletakkan kedalam alat soklet, dan tambahkan pelarut metanol sebanyak 400 mL dan dilakukan sokletasi dengan suhu 70°C sampai larutan mendekati tidak berwarna (tersari semua). Hasil ekstraksi pertama ini disebut ekstrak total, kemudian simpan. Simplisia yang tersisa (fraksi residu) hasil proses sokletasi pertama kemudian ditambahkan ke peralatan sokletasi, kemudian diulang proses sokletasi dengan larutan n-heksan sebanyak 400 mL pada suhu 70°C. Hasil ekstraksi kedua ini disebut fraksi n-heksan. Fraksi residu kemudian dilakukan ekstraksi ketiga menggunakan pelarut

nonpolar (etil asetat) untuk didapatkan fraksi non polar (etil asetat). Kemudian dari fraksi residu dilakukan re-ekstraksi dengan pelarut polar (metanol) dengan cara yang serupa seperti fraksi sebelumnya dan dihasilkan fraksi polar (metanol).⁶

Skrining Fitokimia

Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 1 ml *infus* ditambahkan ke tabung reaksi. Kemudian 1 ml asam klorida (HCL) 2 N ditambahkan. Setiap 1 ml filtrat diambil dan ditambahkan kedalam tabung reaksi yang telah diberi label 1,2 dan 3. Setelah hal tersebut, pada tabung reaksi 1 dimasukkan 2 tetes pereaksi *mayer*, dan pada tabung reaksi 2 ditambahkan 2 tetes pereaksi *wagner*, dan pada tabung reaksi 3 ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendorff*. Pemeriksaan *alkaloid* menunjukkan hasil positif bila terbentuk endapan putih pada tabung reaksi 1, endapan coklat pada tabung reaksi 2, dan endapan jingga pada tabung reaksi 3. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Pemeriksaan Fenol

Sebanyak 1 ml sampel ditambahkan ke tabung reaksi. Kemudian masukkan 3 tetes air panas dan 3 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Pemeriksaan *fenol* menunjukkan hasil positif ditandai dengan perubahan warna larutan membentuk warna biru, hijau, atau ungu. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Pemeriksaan *Flavonoid*

1 ml sampel ditambahkan ke tabung reaksi, kemudian dimasukkan serbuk magnesium sebanyak 1 gram dan 1 ml larutan asam klorida pekat. Keberadaan *flavonoid* ditandai dengan berubahnya warna larutan dalam tabung reaksi membentuk warna kuning. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Pemeriksaan *Steroid* dan *Terpenoid*

1 ml sampel ditambahkan ke tabung reaksi, kemudian dimasukkan asam asetat glasial sebesar 1 ml dan asam sulfat pekat sebesar 1 ml. Keberadaan *terpenoid* ditandai dengan berubahnya warna larutan dalam tabung reaksi membentuk warna merah. Sementara itu, keberadaan *steroid* ditandai dengan berubahnya warna larutan dalam tabung reaksi membentuk warna biru atau ungu. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Pemeriksaan *Saponin*

2 ml sampel dimasukkan ke tabung reaksi, lalu masukan air sebanyak 10 ml. Kemudian tabung reaksi digoyang dengan waktu 10 menit dengan kuat lalu 10 menit berikutnya tabung reaksi dидiamkan. Keberadaan saponin ditandai dengan terbentuknya busa atau buih yang menetap dalam waktu lebih dari 10 menit. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Pemeriksaan *Tanin*

1 ml sampel ditambahkan ke tabung reaksi, lalu 3 tetes besi (III) klorida 5% ditambahkan. Keberadaan *tanin* ditandai dengan berubahnya warna larutan pada tabung reaksi membentuk warna biru tua. Pemeriksaan ini dilakukan pengulangan sebesar 3 kali.⁶

Uji Reaksi Antioksidan melalui Metode DPPH (*1,1 Difenil-2-Pikril-Hidrazil*)

Pembuatan Larutan DPPH 0,1 mM

1,97 mg Kristal DPPH ditambahkan ke labu ukur 50mL. Kemudian tambahkan larutan metanol *p.a* hingga 50 mL lalu dihomogenkan. Larutan DPPH yang telah dihomogenkan harus dilindungi dari cahaya dan harus segera dinilai aktivitasnya⁶

Penetapan λ_{maks} (Panjang Gelombang Maksimum) Larutan DPPH 0,1 mM

Penetapan aktivitas reaksi antioksidan hasil fraksinasi daun nyamplung diawali dengan menentukan λ_{maks} (panjang gelombang maksimum) DPPH 0,1 mM dalam metanol menggunakan spektrofotometri. Larutan tersebut dipastikan absorbansinya dengan λ_{maks} dalam rentang 400-800 nm.⁶

Pengerjaan Larutan Sampel Standar

100 mg sampel uji ditambahkan ke labu ukur 10 mL. Kemudian dilarutkan dengan larutan metanol *p.a* hingga 10 mL pada konsentrasi 10000 $\mu\text{g/mL}$ (konsentrasi 1%).⁶

Pembuatan Larutan Vitamin C Standar

Serbuk vitamin sebanyak 5 mg ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan dilarutkan dengan larutan metanol *p.a* hingga 50 mL pada konsentrasi 100 µg/mL (konsentrasi 0,01%).⁶

Pembuatan Larutan Uji Sampel

Larutan standar sampel masing-masing dipipet sebanyak 100 µL, 200 µL, 300 µL, dan 400 µL ke dalam labu ukur 10 mL, lalu ditambahkan metanol *p.a* hingga 10 mL sehingga diperoleh larutan uji sampel dengan 4 seri konsentrasi yaitu 100 µL, 200 µL, 300 µL, dan 400 µL.⁶

Pembuatan Larutan Uji Vitamin C

Larutan standar vitamin C masing-masing diambil menggunakan pipet mikro sebanyak 100, 200, 300, dan 400 µL ke dalam labu ukur 10 mL. Metanol *p.a* kemudian dimasukkan hingga mencapai 10 mL sehingga diperoleh larutan uji vitamin C dengan seri konsentrasi 100, 200, 300 dan 400 µL.⁶

Pengukuran Absorbansi Peredaman Radikal

Penilaian aktivitas reaksi antioksidan dapat dilakukan dengan uji DPPH (*1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil*). Larutan uji sampel (dengan berbagai konsentrasi) sebesar 1 mL ditambahkan ke 2 mL DPPH 0,1 mM. yaitu 100, 200, 300, dan 400 µg/mL. Masing – masing larutan uji diambil 1 ml dan ditambahkan ke 2 mL DPPH 0,1 mM, lalu

dikocok dan disimpan dalam suhu ruangan dalam waktu setengah jam di tempat gelap. Kemudian diukur absorbansi dengan spektrofotometer UV-Vis ($\lambda_{maks}=515\text{ nm}–520\text{ nm}$).⁶ Setelah didapat absorbansi, dihitung IC⁵⁰

$$\% (IC^{50}) = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan :

A = Nilai absorbansi

HASIL

Pemrosesan Sampel

Sampel daun nyamplung dari pohon pada waktu pagi hari sekitar pukul 08.00-11.00 dengan cuaca yang cerah. Bagian daun yang diambil adalah daun yang masih berwarna hijau muda, tidak layu dan tidak terlalu tua. Daun diambil dengan cara memetik langsung dari dahan tanpa menggunakan alat. Banyaknya daun seberat 2 kilogram. Daun yang telah diambil kemudian dibersihkan dari kotoran menggunakan sikat lembut dan dibilas dengan air mengalir dari air PAM sampai bersih. Daun kemudian dilakukan pengeringan dengan metode penjemuran dibawah sinar matahari untuk digunakan selanjutnya untuk pembuatan simplisia. Simplisia selanjutnya dilakukan pemisahan / sortasi kering dan diblender hingga halus dan didapatkan 1000 gram simplisia halus. Kemudian dilakukan pemeriksaan kadar air. Hasil pemeriksaan kadar air pada simplisia

didapatkan kadar air senilai 7,9%. Kadar air dengan nilai dibawah 10% memperlihatkan baiknya proses pengeringan dan mempunyai karakteristik simplisia yang baik untuk disimpan.⁷

Penapisan (Skrining) Fitokimia dari Ekstrak Total Daun Nyamplung

Penapisan (*skrining*) fitokimia pada berbagai fraksi daun nyamplung

menunjukkan keberadaan kandungan senyawa fitokimia antara lain *flavonoid*, *fenol*, *terpenoid*, *steroid* dan *tanin*. Sementara itu senyawa fitokimia berupa *alkaloid*, dan *saponin* tidak ditemukan. Hasil skrining *fitokimia* terhadap daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum*) ditunjukkan di Tabel 1

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Daun Nyamplung

No.	Pemeriksaan	Pereaksi	Hasil	Keterangan
1	Alkaloid	Mayer	-	Tidak terbentuk endapan putih
		Dragendorff	-	Tidak terbentuk endapan jingga
		Wagner	-	Tidak Terbentuk endapan coklat
2	Fenol	Air panas, FeCl ₃ 1%	+	Terbentuk warna hijau
3	Flavonoid	Mg, HCl	+	Terbentuk warna kuning
4	Steroid	CH ₃ COOH, H ₂ SO ₄	+	Terbentuk warna biru atau ungu
5	Terpenoid	CH ₃ COOH, H ₂ SO ₄	+	Terbentuk warna merah
6	Saponin	Aquadest panas	-	Tidak Terbentuk buih/busa yang bertahan lebih dari 10 menit
7	Tanin	FeCl ₃ 5%	+	Terbentuk warna biru tua

Uji Aktivitas Antioksidan Hasil Fraksinasi Daun Nyamplung dengan Metode DPPH

Metode uji aktivitas antioksidan dilakukan melalui uji DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan daun nyamplung ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Daun Nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) Metode DPPH

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi Blanko	Absorbansi Sampel	% Aktivitas antioksidan	Persamaan	IC ₅₀ (µg/mL)
Vitamin C	100	0,13	0.082	36.92	y = 15.769x + 15 R ² = 0.9046	23.58
	200		0.079	39.23		
	300		0.054	58.46		
	400		0.022	83.08		

Ekstrak total	100	0,13	0.104	20.00	$y = 7.4615x +$	12.65
	200		0.094	27.69	41.923	
	300		0.078	40.00	$R^2 = 0.9909$	
	400		0.066	49.23		
Fraksi n-heksan	100	0,13	0.066	49.23	$y = 11.154x -$	4.62
	200		0.055	57.69	1.5385	
	300		0.048	63.08	$R^2 = 0.9481$	
	400		0.036	72.31		
Fraksi etil-asetat	100	0,13	0.114	12.31	$y = 11.154x -$	4.62
	200		0.106	18.46	1.5385	
	300		0.093	28.46	$R^2 = 0.9481$	
	400		0.07	46.15		
Fraksi metanol	100	0,13	0.057	56.15	$y = 4.5385x +$	53.19
	200		0.054	58.46	50.385	
	300		0.049	62.31	$R^2 = 0.932$	
	400		0.039	70.00		

DISKUSI

Dari penelitian ini didapatkan bahwa penilaian aktivitas reaksi antioksidan daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum* L.) melalui uji DPPH menunjukkan adanya hubungan korelasi positif antara kadar konsentrasi dengan nilai absorbansi, dimanameningkatnya konsentrasi sampel ujiakan berbanding lurus dengan penurunan absorbansi DPPH.⁸ Hal ini membuktikan bahwa hasil fraksinasi daun nyamplung memiliki kemampuan untuk meredam radikal bebas sebagai antioksidan.

Standar ukur untuk menilai aktivitas reaksi antioksidan pada eksperimen ini adalah *Inhibitory Concentration* (IC_{50}).⁵ Berdasarkan hasil IC_{50} dari hasil fraksinasi daun nyamplung yang diperoleh dapat ditarik kesimpulan bahwa hasil fraksinasi daun nyamplung mempunyai potensi mulai kuat hingga sangat kuat sebagai antioksidan

dimana fraksi etil asetat merupakan fraksi yang paling kuat dan hasil fraksinasi daun nyamplung lebih baik daripada vitamin C sebagai antioksidan dalam meredam radikal bebas DPPH.

Pada proses fraksinasi di eksperimen ini, fraksinasi dilakukan berdasarkan kelarutan senyawa terhadap pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Proses fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya akan mempengaruhi jenis dan kadar senyawa bioaktif serta aktivitas antioksidannya.⁷ Fraksinasi daun nyamplung dilakukan dengan menggunakan pelarut non-polar (n-heksan), semi-polar (etil-asetat) dan polar (metanol).

Fraksinasi dilakukan berdasarkan prinsip *like dissolve like*, yaitu pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan pelarut non-polar akan melarutkan senyawa non-

polar. Pada penelitian ini, fraksi etil asetat menunjukkan efektifitas yang paling tinggi sebagai antioksidan DPPH. Aktivitas antioksidan pada ekstrak etil-asetat berkaitan erat dengan sifat etil-asetat sebagai pelarut semi-polar yang mampu melarutkan berbagai komponen bioaktif.¹¹ Hal ini disebabkan struktur etil asetat yang bersifat semipolar, sehingga mampu mengikat senyawa non-polar, semi-polar dan polar. Senyawa *fenol* adalah antioksidan alami yang umumnya didapatkan dari tumbuhan. Senyawa *fenol* juga bersifat semi polar, sehingga lebih banyak terikat dengan larutan etil asetat.⁹

Flavonoid memiliki ikatan *difenilpropan*, aktivitas antioksidannya bergantung pada jumlah kelompok *hidroksil* dan posisinya pada molekul. Potensi antioksidannya bergantung dari struktur dalam hal delokalisasi elektron dari inti aromatik. Untuk asam *fenolik* seperti *calophyllic acid (IA)*, *isocalophyllicacid (IB)*, dan derivat esternya, aktivitas antioksidan bergantung pada jumlah ikatan *hidroksil* pada molekul yang bergantung pada *inhibisi sterik* dari kelompok *karboksilat* yang dimilikinya. *Terpenoid* memiliki ikatan ganda terkonjugasi sehingga memiliki potensi sebagai antioksidan, karena elektronnya dapat disumbangkan untuk menstabilkan muatan molekul reaktif.¹⁰

Pada daun nyamplung didapatkan *Calophyllic-acid(IA)* dan *isocalophyllic-acid(IB)* dan senyawa ini larut dalam larutan non polar. *Terpenoid* jenis *triterpenoid* larut pada larutan non-polar karena *triterpenoid* memiliki rantai hidrokarbon yang panjang sehingga bersifat *hidrofob* sementara *monoterpenoid* pada pelarut polar. *Flavonoid* larut dalam larutan polar, kecuali *flavonoid* bebas seperti *isoflavon*, *flavon*, *flavanon* dan *flavonol* termetoksilasi dapat dengan lebih mudah terlarut didalam larutan semipolar.¹¹ Dari segi kepolaran larutan, nilai aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat paling tinggi, karena larutan etil asetat yang bersifat semi-polar mampu mengekstrak *fenol* lebih baik.⁸

Pada penelitian lain yang dilakukan Malarvizhi, dilakukan penilaian aktivitas reaksi antioksidan dari ekstrak daun *Calophyllum inophyllum* dengan ekstrak aseton, air terdestilasi dan etil asetat, didapatkan bahwa pada pelarut semi polar yaitu etil asetat didapatkan aktivitas antioksidan paling tinggi. Hal ini diprediksi akibat jumlah *flavonoid* dan *polifenol* pada pelarut semi polar. Pada ekstrak total, aktivitas reaksi antioksidan sebesar 12,65 ppm, lebih kecil daripada etil asetat sebesar 4,60ppm. Hal ini menunjukkan beberapa senyawa antioksi dan berinteraksi antagonis dalam menetralkan radikal bebas. Ekstrak total masih merupakan paduan/asimilasi

dari berbagai senyawa dalam fraksi tersebut. Efek antagonis dapat menyebabkan menurunnya kemampuan reaksi antioksidan dari ekstrak total dalam meredam radikal bebas dibandingkan fraksi etil asetat.¹⁰

Senyawa *fenol* dapat bekerja secara saling mendukung (sinergis) dan antagonis dalam menghambat radikal bebas. Namun demikian penelitian *in vitro* untuk menganalisis korelasi antara aktivitas *fenolik* total dan antioksidan total tidak mencerminkan karakteristik *fenolik* ini. Adanya gugus lain dalam ekstrak total dapat mengakibatkan *flavonoid* termetilasi.¹² Perubahan atom -H menjadi gugus metil (-CH₃) melalui reaksi metilasi dapat menurunkan aktivitas antioksidan.¹³ Penelitian lebih mendalam secara *in-vivo* dibutuhkan untuk mengetahui interaksi fenolik karena aktivitas antioksidan secara *in-vitro* tidak dapat menilai efektivitas biologikal dari ekstrak. Penelitian lebih mendalam yang dibutuhkan adalah uji toksisitas, stabilitas dan farmakologi sehingga daun ini dapat menjadi salah satu referensi penelitian lebih mendalam di bidang farmakologi.

KESIMPULAN

Daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) mempunyai aktivitas reaksi antioksidan dengan nilai IC₅₀ pada masing-masing hasil fraksinasi yaitu ekstrak total

sebesar 12.65 ppm, fraksi n-heksan 46.44 ppm, fraksi etil asetat 4.62 ppm dan fraksi metanol sebesar 53.19 ppm. Daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) mempunyai aktivitas antioksidan dalam rentang sangat kuat dan kuat yaitu ekstrak total dan fraksi etil asetat dengan aktivitas antioksidan sangat kuat, serta fraksi n-heksan dan metanol dengan aktivitas antioksidan kuat. Penelitian terkait isolasi senyawa pada daun nyamplung (*Calophyllum inophyllum L.*) diperlukan untuk menghasilkan senyawa – senyawa tunggal murni serta hendaknya direncanakan penelitian lebih mendalam mengenai daun nyamplung secara *in vivo* yaitu uji toksisitas, sensitivitas dan farmakologi.

DAFTAR REFERENSI

1. Victor W Rodwell, Kathleen M. Botham, P. Anthony Weil, Peter J. Kennelly, Robert K. Murray DAB. Biokimia Harper. 30th ed. EGC; 2017.
2. Winarsi H. Antioksidan Alami Dan Radikal Bebas: Potensi Dan Aplikasi Dalam Kesehatan. Kanisius; 2007.
3. Sunarni T, Pramono S, Asmah R. *Antioxidant-free radical scavenging of flavonoid from The Leaves of Stelechocarpus burahol (Bl.) Hook f. & Th. Indones J Pharm.* 2017;18(3):111-116.
4. Fitri N. *Butylated hydroxyanisole*

- sebagai Bahan Aditif Antioksidan pada Makanan dilihat dari Perspektif Kesehatan. *J Kefarmasian Indones.* 2013;4(1):41-50.
5. Dutta S, Ray S. Evaluation of Antioxidant Potentials of Leaf Aqueous and Methanolic Extracts of *Calophyllum Inophyllum* in Relation to Total Phenol and Flavonoid Contents. *Int J Pharma Bio Sci.* 2014;5:441-450.
 6. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841-1856. doi:10.1021/jf030723c
 7. Khan MA, Rahman AA, Islam S, et al. A Comparative Study on the Antioxidant Activity of Methanolic Extracts from Different Parts of *Morus alba L. (Moraceae)*. *BMC Res Notes.* 2013;6:24. doi:10.1186/1756-0500-6-24
 8. Varsha G, Uma Maheswari B, Ramasamy M, Karunanithi M. Effect of Ethanolic Extract of *Calophyllum Inophyllum* Leaves On Oxidative Stress Complications in Mouse Model. *Asian J Pharm Clin Res.* 2016;9(3):2-4.
 9. Kedare SB, Singh RP. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay. *J Food Sci Technology.* 2011;48(4):412-422. doi:10.1007/s13197-011-0251-1
 10. Malarvizhi P, Ramakrishnan N. Biogenic Silver Nanoparticles Using *Calophyllum Inophyllum* Leaf Extract : Synthesis , Spectral. *World J Pharm Res.* 2014;3(2):2258-2269.
 11. Jaikumar K, Sheik Noor Mohamed M, John Wyson W, et al. In silico docking analysis of bioactive compounds from *Calophyllum inophyllum l.* Ethanol leaf extract against epidermal growth factor receptor (EGFR) protein. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(8):214-219. doi:10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18972
 12. Govindappa M, Hemmanur KC, Nithin S, Chinna Poojari C, Bhat G, Channabasava K. In Vitro Anti-HIV Activity of Partially Purified Coumarin(s) Isolated from *Fungal Endophyte, Alternaria Species* of *Calophyllum inophyllum*. *Pharmacol & Pharm.* 2015; 06(07):321-328. doi:10.4236/pp.2015.67034
 13. Malarvizhi P, Ramakrishnan N. GC-MS Analysis of Biologically Active Compounds In Leaves of *Calophyllum Inophyllum L.* *Int J ChemTech Res.* 2011;3(2):806-809.