

AKTIVITAS PENANGKAP RADIKAL BEBAS DARI BATANG PAKIS (*Alsophila glauca* J. Sm)

FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF (*Alsophila glauca* J. Sm)

Sri Wahdaningsih^{1,*}, Erna Prawita Setyowati², Subagus Wahyuono²

¹. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Tanjungpura Pontianak

². Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta

ABSTRAK

Stress oksidatif yang diinduksi oleh radikal telah diketahui dapat mempengaruhi terjadinya berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, penyakit jantung koroner dan penuaan dini. Tubuh yang tidak mempunyai sistem pertahanan antioksidan dalam jumlah berlebih sehingga tubuh membutuhkan antioksidan dari luar melalui makanan atau asupan nutrisi lainnya. Batang pakis (*Alsophila glauca* J. Sm.) diketahui mengandung senyawa fenol. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa senyawa fenol mempunyai aktivitas antioksidan. Sebagai upaya dalam pencarian senyawa antioksidan alami maka telah dilakukan penelitian pengujian aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas dari batang pakis. Penyarian batang pakis dilakukan secara maserasi dengan wasbenzen. Ekstrak didapat dengan menguapkan pelarut wasbenzen dengan rotavapor. Setelah semua wasbenzen menguap bahan dimaserasi lagi dengan metanol. Ekstrak diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara KLT. Ekstrak aktif kemudian dipartisi dengan metanol 80 %. Memberikan ekstrak larut dan tidak larut dalam metanol 80 % yang kemudian diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (KLT). Ekstrak aktif lebih lanjut difraksinasi dengan kromatografi cair vakum dengan menggunakan fase gerak dengan gradient kepolaran yang berbeda (wasbezen : kloroform). Fraksi yang didapat diuji aktivitas antioksidannya. Fraksi yang aktif diisolasi dengan metode KLT preparatif dan diperoleh senyawa yang kemurniannya diuji secara KLT. Isolat yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara spektrofotometri. Isolat aktif mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal lebih rendah dibandingkan quercetin sebagai kontrol positif (IC_{50} 178,4 v/s 2,17 μ g/mL)

Kata kunci : Batang pakis, antioksidan, DPPH (2,2-Difenil-1 pikrilhidrazin)

ABSTRACT

Free radical induced oxidative stress that influences the occurrence of various degenerative diseases such as cancer, coronary heart disease and premature aging. In the case that body's antioxidant defense system does not have excessive antioxidants, additional natural antioxidant via food or other nutrients intake is needed. Stems of ferns are known to contain phenolic compounds that are known to have antioxidant activity. A study has been carried out to determine antioxidant potential of stems of ferns of western Borneo origin compared to quercetin as positive control. Initially, material was macerated gradually with wasbenzen followed by methanol. The extract obtained was filtered and evaporated to dryness to give dried wasbenzen extract and methanol extract respectively. Antioxidant properties of extracts were performed by DPPH on TLC. Active (wasbenzen) extract was then partitioned with 80% methanol to give soluble and insoluble fractions. Active (insoluble) fraction was further fractionated by vacuum liquid chromatography using a gradient mobile phase with increasing polarity (wasbezen: chloroform). Fractions obtained were tested antioxidant activity, and isolation was done by preparative TLC. The purity of isolated antioxidant compound was confirmed by TLC, and antioxidant potential was measured spectroscopically with DPPH method. This compound displayed antioxidant activity, but its value was lower than that of quercetin used as a positive control (IC_{50} 178.4 v / s 2.17 microg / mL)

Kata kunci : Batang pakis, antioksidan, DPPH (2,2-Difenil-1 pikrilhidrazin)

PENDAHULUAN

Tumbuhan paku (pakis) diyakini secara empiris dapat menyembuhkan luka. Kandungan

kimia yang dilaporkan dalam tumbuhan pakis adalah senyawa saponin, tanin, fenol dan terpenoid. Berdasarkan penelitian, senyawa

golongan fenolik menunjukkan aktivitas antioksidan yang poten. Korelasi antara kadar senyawa golongan fenolik atau flavonoid dengan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH sangat tinggi (Maisuthisakul & Pasuk, 2007).

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital terluarnya sehingga sangat reaktif. Radikal ini cenderung mengadakan reaksi berantai yang apabila terjadi di dalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus menerus. Tubuh manusia memiliki sistem pertahanan endogen terhadap serangan radikal bebas terutama terjadi melalui peristiwa metabolisme sel normal dan peradangan. Jumlah radikal bebas dapat mengalami peningkatan yang diakibatkan faktor stress, radiasi, asap rokok dan polusi lingkungan menyebabkan sistem pertahanan tubuh yang ada tidak memadai, sehingga tubuh memerlukan tambahan antioksidan dari luar yang dapat melindungi dari serangan radikal bebas.

Antioksidan digunakan juga dalam makanan untuk mengontrol oksidasi lipid. Senyawa *t*-butil hidroksi anisol (BHA) dan *di-t*-butil hidroksitoluen (BHT) digunakan sebagai antioksidan pangan, tetapi adanya kemungkinan efek samping yang merugikan maka tidak digunakan untuk bahan terapi. Pengembangan antioksidan alamiah mendapat perhatian besar beberapa tahun terakhir. Hal ini dimaksudkan untuk tujuan pengobatan preventif dan untuk industri makanan. Antioksidan alami selain dapat melindungi tubuh dari serangan radikal bebas juga mampu memperlambat terjadinya penyakit kronik yang disebabkan penurunan spesies oksigen reaktif (ROS) terutama radikal hidroksil dan radikal superoksida. Antioksidan alami juga berfungsi menghambat oksidasi lipid yang menyebabkan ketengikan dan kerusakan pada

*Korespondensi : Sri Wahdaningsih
Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Farmasi dan
Keperawatan Universitas Tanjungpura, Pontianak
Email :

makanan (Halliwell & Gutteridge, 1999; Rohdiana, 2001).

METODOLOGI

Bahan: tumbuhan batang pakis berasal dari jalan Kota Baru, Pontianak, Kalimantan Barat. Bahan kimia yang digunakan wasbenzen, kloroform, metanol, aquadest, n-hexana, lempeng silika gel F₂₅₄, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), pereaksi serum sulfat, Bahan kimia yang digunakan berderajat pro analisis E. Merck kecuali DPPH (Sigma, Chem.Co). Alat yang digunakan

bejana maserasi tertutup (stoples), corong buchner, pengaduk, rotary evaporator, labu erlenmayer, plat aluminium silika gel F₂₅₄, plat kaca, corong pisah, kolom gelas untuk kromatografi cair vakum (sinterglass), pipet tetes, pipa kapiler dan lain-lain.

Isolasi senyawa aktif

Serbuk kering disari dengan tiga kali maserasi selama 24 jam pada suhu kamar masing-masing 2000, 1750, 1500 ml menggunakan pelarut wasbenzen. Penyaringan dilakukan dengan corong Buchner dan ampas dimaserasi dua kali lagi dengan cara yang sama kemudian disaring. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak. Ampas diangin-anginkan sampai terbebas dari bau wasbenzen. Kemudian dengan cara yang sama seperti pada penyarian dengan wasbenzen, ampas tersebut disari menggunakan metanol. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol. Pemisahan senyawa aktif dalam ekstrak dilakukan dengan partisi. Proses partisi sangat bergantung pada daya larut solute dalam pelarut yang tidak saling campur dan berbeda polaritasnya.

Uji Pendahuluan antioksidan penangkap radikal

Uji antioksidan penangkap radikal dilakukan sesuai metode Demirezer dkk (2001). Kromatogram dikeringkan dan disemprot dengan larutan 0,2% DPPH dalam metanol. Kromatogram diperiksa 30 menit setelah penyemprotan. Senyawa aktif penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna putih kekuningan dengan latar belakang ungu.

Kromatografi cair vakum

Sebelum dilakukan kromatografi cair vakum, dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) pendahuluan terhadap ekstrak aktif dengan menggunakan berbagai variasi pengembang agar didapat eluen yang sesuai pada kromatografi kolom.

Kromatografi cair vakum dilakukan dengan cara 2 gram ekstrak diencerkan dengan pelarut yang cocok dalam cawan porselin, kemudian dikeringkan dengan silika gel F₂₅₄ sampai menjadi serbuk kering. Sinterglas diisi dengan serbuk fase diam silika gel F₂₅₄ sampai mencapai ketinggian ± ½ dari tinggi sinterglas, kemudian serbuk sampel diletakkan di atasnya. Serbuk sampel ditutup dengan kertas saring. Dilakukan elusi secara vakum dengan fase gerak yang polaritasnya meningkat.

Masing-masing fraksi dilakukan KLT dengan fase gerak yang sama dan bercak yang menunjukkan kesamaan digabung. Masing-masing fraksi gabungan diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

KLT preparatif

Senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi diisolasi dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase diam silika gel F₂₅₄, tebal 0,5mm. Pembuatan plat preparatif dilakukan dengan mencampur 40 gram silika gel F₂₅₄ dengan 80 ml air dalam erlenmeyer tertutup, dikocok selama ± 2 menit, lalu dihamparkan pada plat kaca berukuran 20 x 20 cm, kemudian plat silika ini dibiarkan kering pada suhu kamar dan diaktifkan dalam oven pada suhu 100°C selama ± 60 menit. Plat yang kering didinginkan sampai siap digunakan. Larutan senyawa ditotolkan pada lempeng berbentuk pita memanjang. dan dapat dilakukan beberapa kali tetapi setelah totolan sebelumnya kering. Plat yang telah ditotol dimasukkan ke dalam bejana yang berisi larutan pengembang. Setelah pengembangan selesai, plat dikeluarkan dan dibiarkan hingga fase geraknya menguap. Untuk mengetahui bercak pita yang akan dikerok, plat diamati di bawah lampu UV₂₅₄ dan langsung ditandai bagian-bagian yang akan dikerok. Serbuk hasil kerokan dilarutkan dalam pelarut kloroform, diaduk dengan pengaduk magnetik (stirrer), kemudian disaring dengan penyaringan vakum. Hasil penyaringan ini diuapkan dan diperoleh isolat (filtrat) yang kering.

Pemeriksaan kemurniaan dengan KLT

Filtrat yang kering dilarutkan lagi dalam pelarut campuran metanol-kloroform (1:1 v/v) lalu ditotolkan pada lempeng silika gel F₂₅₄ dan dikembangkan dalam pengembang yang sesuai dengan sistem KLT preparatif. Selanjutnya dideteksi di bawah sinar UV₂₅₄ dan pereaksi penampak bercak serum sulfat. Kemurnian isolat juga dikembangkan dengan dua fase gerak yang berbeda dengan berbagai perbandingan.

Uji aktivitas antioksidan

Senyawa-senyawa yang telah terpisah melalui isolasi secara KLT preparatif diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Kwon & Kim (2003). Larutan isolat dalam kloroform pada beberapa konsentrasi (1-32 µg/ml) sebanyak 1,2 ml ditambah 0,3 ml larutan DPPH 0,5 mM dalam kloroform sehingga volume total campuran 1,5 ml dan campuran dikocok kuat. Setelah didiamkan pada temperatur kamar selama 30 menit, sisa DPPH ditentukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 517 nm. Pengujian

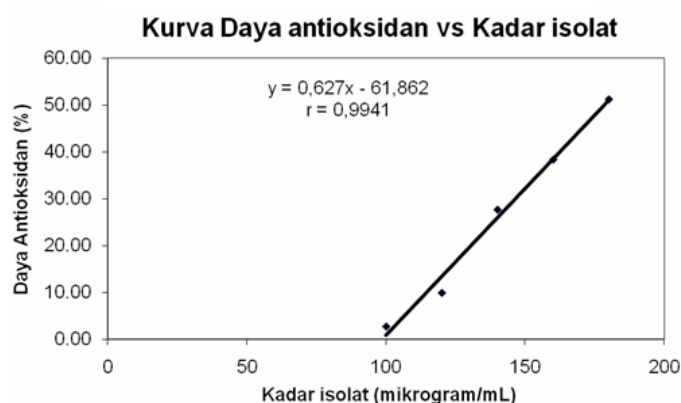
ini juga dilakukan pengukuran terhadap blanko (larutan DPPH yang tidak mengandung bahan uji) serta kontrol positif kuersetin. Aktivitas penangkap radikal DPPH(%) dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas} = \frac{(A \text{ blanko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blanko}} \times 100 \%$$

Data aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH hasil isolat dan kuersetin dianalisis dan masing-masing dihitung nilai IC₅₀ melalui analisis probit. IC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% DPPH. Pengujian dilakukan dengan lima kali replikasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Telah dilakukan ekstraksi, isolasi dan uji aktivitas senyawa antioksidan penangkap radikal bebas dari batang pakis. Ekstraksi dilakukan dengan cara serbuk kering disari dengan cara tiga kali maserasi selama 24 jam pada suhu kamar masing-masing 2000, 1750, 1500 ml menggunakan pelarut wasbenzen. Penyaringan dilakukan dengan corong Buchner dan ampas dimaserasi dua kali lagi dengan cara yang sama kemudian disaring. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak. Ampas diangin-anginkan sampai terbebas dari bau wasbenzen. Kemudian dengan cara yang sama seperti pada penyarian dengan wasbenzen, ampas tersebut disari menggunakan metanol. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol. Kedua ekstrak ini di uji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara KLT. Ekstrak aktif (ekstrak wasbenzen) dipartisi menggunakan metanol 80% . Diperoleh bagian yang larut metanol dan bagian yang tidak larut metanol.



Gambar 1. Kurva daya anti oksidan vs kadar isolat

Tabel I. Hasil pengukuran daya antioksidan pada isolat

Konsentrasi isolat ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas antioksidan (%)
100	2,68
120	9,86
140	27,61
160	38,30
180	51,17

Tabel II. nilai IC_{50} hasil pengujian aktivitas antioksidan

Nama bahan	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Isolat	178,4
kuersetin	2,17

Ekstrak yang larut dan ekstrak yang tidak larut metanol 80 % diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara KLT. Ekstrak aktif yang tidak larut metanol 80 % difraksinasi dengan kromatografi cair vakum dengan menggunakan fase gerak dengan gradient kepolaran yang berbeda (wasbenzen : kloroform) dengan berbagai konsentrasi. Fraksi yang didapat diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (KLT). Fraksi yang aktif diisolasi dengan metode KLT preparatif dan diperoleh senyawa yang kemurniannya diuji secara KLT.

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH karena merupakan metode yang sederhana, mudah, dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat (Hanani, 2005). Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 517 nm yang merupakan panjang

gelombang maksimum DPPH, dengan konsentrasi DPPH 50 mM. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna violet pekat menjadi kuning pucat (Permana, 2003)

Aktivitas antioksidan dari isolat batang pakis ini dinyatakan dalam persentase inhibisinya terhadap radikal DPPH. Persentase inhibisi ini didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi DPPH dengan absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50 % radikal bebas DPPH.

Hasil uji menunjukkan isolat batang pakis aktif sebagai antioksidan dengan IC_{50} 178,4 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC_{50} isolat lebih besar dari kuersetin yang mempunyai nilai IC_{50} 2,17 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini menunjukkan bahwa isolat dan kuersetin

mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat karena mempunyai IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml (Blouis, 1958). Pengujian aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi ternyata pada konsentrasi yang tertinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi tetapi apabila dibandingkan dengan kuersetin, sampel mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah

KESIMPULAN

Isolat batang pakis mempunyai kemampuan meredam radikal bebas DPPH. Kemampuan meredam radikal bebas DPPH isolat batang pakis lebih kecil dari pada kemampuan kuersetin. Nilai IC₅₀ dari isolat batang pakis adalah 178,4µg/ mL lebih besar dari kuersetin yaitu 2,17 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

Blouis, M. S., 1958, Antioxidant Determinations By The Use Of a Stable Free Radical, *Nature*, 1199-1200.

Demirezer, L.O., Kruuzum-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H.J., & Zeeck, A., 2001, The Structures of Antioxidant and Cytotoxic Agents from Natural Source : Antraquinones and Tannin from Roots of

Rumex patientia, *Phytochemistry*, 58: 1213-1217.

- Halliwell, B. & Gutteridge, JMC., 1999, Free Radical in Biology and Medicine, 3th ed., pp.1-231, 353-425, Oxford University Press, Inc., New York.
- Hanani, E, 2005, Hanani, E, A. Mun'im, R. Sekarini, Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia* SP Dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, Vol II, No 3 (2005). Page 127-133.
- Kwon, Y.S., & Kim, C.M., 2003, Antioxidant Constituent from the Stem of *Sorghum bicolor*, *Arch. Pharm. Res.*, 26 (7) : 535-539.
- Maisuthisakul, P., & Pasuk, S., 2007, Antioxidant Properties and Phenolic Phytochemicals From Various Cultivars of Thai Mango Seed Kernels, laporan penelitian, University of Thai Chamber of Commerce, Bangkok.
- Permana, D.,N. Hj. Lajis, Faridah Abas, A. Ghafar othman, Rohaya Ahmad, Mariko Kitajama, Hiromitsu Takayama, Nario Aimi, Cl, 2003, Antioksidative Constituents Of Hedotis Diffusa Wild “, *Natural Product Sciences*, 9(1), 7-9.
- Rohdiana, D., 2001, Radical Scavengers Polyphenol, *MFI*, 12 (1) : 53-58.