
UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN KARIKA (*Carica pubescens*) DENGAN METODE DPPH BESERTA IDENTIFIKASI SENYAWA ALKALOID, FENOL DAN FLAVONOID

Indranila dan Maria Ulfah

Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

e-mail: mariau_astra@yahoo.com

ABSTRACT

Antioxidant is a compound that can inhibit free radicals. Free radicals can cause several diseases. The purpose of this study is to reveal the antioxidant activity of carica leave ethanol extract (CLEE) (*Carica pubescens*) and determine its active compounds. The extract produces with maceration method using ethanol 96% as a solvent. The antioxidant activities of CLEE series concentration (2.5; 5.0; 10.0; 15.0; 20.0 and 25.0) ppm and vitamin C series concentration of (0.5; 1.0; 1.5; 2.0 and 2.5) ppm as standard antioxidant were measured with DPPH method. Absorbance was observed by spectrophotometer UV-Vis. Antioxidant activities presented by IC_{50} value derived from probit analysis. Identification of active compounds in CLEE was performed by Thin Layer Chromatography (TLC) method. The results showed that the IC_{50} value for CLEE and vitamin C as an antioxidant were 30.8 ppm and 2.9 ppm respectively. Base on TLC analysis, alkaloids, a phenol compound, and flavonoids were found in CLEE.

Key words: antioxidant, *Carica pubescens*, DPPH, TLC

PENDAHULUAN

Dunia kesehatan banyak membahas tentang radikal bebas dan antioksidan. Hal tersebut dikarenakan sebagian besar penyakit terjadi disebabkan adanya reaksi oksidasi yang berlebihan di dalam tubuh. Radikal bebas dapat menyebabkan gangguan fungsi sel, kerusakan struktur sel, molekul termodifikasi yang tidak dapat dikenali oleh sistem imun, dan bahkan mutasi. Semua bentuk gangguan tersebut dapat memicu timbulnya berbagai penyakit (Winarsi, 2007).

Konsumsi antioksidan dalam jumlah memadai dilaporkan dapat menurunkan kejadian penyakit degeneratif, seperti osteoporosis, kardiovaskular, kanker, dan lain-lain. selain itu, konsumsi makanan dan minuman yang mengandung antioksidan juga dapat meningkatkan sistem imun dalam tubuh serta menghambat timbulnya penyakit akibat penuaan. Kecukupan asupan antioksidan secara optimal diperlukan pada semua usia (Winarsi, 2007).

Tanaman karika (*Carica pubescens*) merupakan tanaman khas dataran tinggi Dieng. Karika termasuk dalam satu genus dengan papaya dengan ukuran tanaman yang lebih kecil. Masyarakat saat ini memanfaatkan daun karika sebagai pelunak daging (Hidayat, 2001). Daun karika memiliki khasiat sebagai antibakteri yang dapat digunakan untuk terapi penyakit diare. Senyawa fitokimia yang terkandung di dalam daun karika (*Carica pubescens*) adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol (Novalina, 2013). Buah karika terbukti mengandung vitamin C dan memiliki aktivitas antioksidan (Fatchurrozak, dkk., 2013; Laily, dkk., 2012). Selain vitamin C, senyawa aktif bahan alam yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan antara lain adalah senyawa alkaloid, polifenol dan flavonoid (Tjaj dan Raharja, 2010).

Berdasarkan beberapa hal tersebut dan didukung dengan penelitian terdahulu tentang adanya kandungan senyawa aktif alkaloid, senyawa fenol, flavonoid dan tanin dalam daun karika tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun karika. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun karika dilakukan dengan metode DPPH dan ditetapkan aktivitasnya dalam nilai *Inhibition Concentration* 50 (IC_{50}). Identifikasi kandungan senyawa alkaloid, senyawa fenol dan flavonoid ditetapkan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun karika yang diperoleh dari Desa Sembungan, Kecamatan Dieng, Wonosobo. Bahan kimia dan pereaksi yang digunakan adalah etanol 96%, DPPH (Sigma), vitamin C (Sigma), ferri klorida, serbuk magnesium, HCl, pereaksi Dragendorff, silika gel 60 F₂₅₄, metanol, amonia, asam formiat 10%, butanol, asam asetat, air, uap amoniak, kuinin, asam gallat, rutin (Sigma).

Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, timbangan elektrik, rotary evaporator (Heidolph), corong buchner, erlenmeyer, seperangkat alat gelas, blender, alat-alat gelas (Pyrex), *micro pipet* (Socorex), kuvet, vortex, timbangan elektrik (*Ohaus*), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), lempeng KLT, vortex, pipa kapiler, *chamber* (Cammag), lampu UV (Cammag), botol semprot deteksi dan oven (Memmert).

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Karika

Daun karika dipetik, disortir untuk memisahkannya dengan tanaman lain. Selanjutnya, daun karika dicuci bersih dengan air mengalir, ditiriskan dan diangin-anginkan. Daun karika dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C. Setelah simplisia kering, simplisia kemudian diblender dan diayak dengan ayakan 40 mesh, serta diukur kadar airnya dengan alat *moisture balance*.

Pembuatan ekstrak pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Sebanyak 1,0 Kg serbuk simplisia daun karika dimasukkan ke dalam toples kaca berukuran besar, ditambah cairan penyari etanol 96% sebanyak 7,0 mL, ditutup rapat dan didiamkan selama lima hari, terlindung dari paparan cahaya dan sesering mungkin diaduk. Setelah lima hari, rendaman simplisia daun karika diserakai. Hasil serkaian disebut sebagai maserat I. Ampas diremaserasi dengan etanol 96% sebanyak 3,0 L selama dua hari dan diserakai kembali (maserat II). Maserat I dan II dicampur, sisa pelarut diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak disimpan dalam wadah kaca tertutup rapat dan terlindung dari paparan cahaya matahari.

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Karika dengan Metode DPPH

Ekstrak etanol daun karika dibuat dalam seri konsentrasi (2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 dan 25,0) ppm. Seri konsentrasi vitamin C (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 and 2.5) ppm digunakan sebagai larutan antioksidan standar. Sebanyak 2,0 mL larutan DPPH 0,1 mM ditambahkan dengan 2,0 mL larutan sampel (seri konsentrasi ekstrak etanol daun karika atau vitamin C), kemudian divortex, lalu didiamkan dalam tempat gelap selama 30 menit. Absorbansi larutan DPPH 0,1 mM dibaca dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516,6 nm. Perbandingan absorbansi sampel dan absorbansi larutan kontrol digunakan dalam perhitungan persentase aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun karika atau vitamin C terhadap radikal bebas DPPH.

Identifikasi Kandungan Senyawa Aktif dalam Ekstrak Etanol Daun Karika dengan Metode KLT

Senyawa Alkaloid

Sampel ekstrak etanol daun karika ditimbang sebanyak 100 mg, ditambahkan dengan 2 mL amonia 10% dan divortex selama dua menit. Selanjutnya, sebanyak 5 mL kloroform ditambahkan ke dalam sampel dan divortex selama dua menit. Larutan sampel disentrifugasi selama tiga menit, dan selanjutnya fase kloroform dipisahkan. Fase kloroform diuapkan dengan gas nitrogen dan kemudian dilarutkan dalam 200 µL kloroform. Sampel ditotolkan sebanyak 20 µL pada lempeng silika (fase diam) dan dimasukkan ke dalam *chamber* yang telah dijenuhi dengan fase gerak metanol : amonia (100 : 1,5). Fase diam dilusi hingga batas (8 cm), kemudian diangkat dan dikeringkan. Bercak yang terbentuk diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan diamati secara visibel.

Senyawa fenol

Sampel ekstrak etanol daun karika ditimbang sebanyak 50 mg, ditambahkan metanol 1 mL,

divortex selama dua menit, kemudian disentrifuge. Larutan sampel ditotolkan sebanyak 20 μ L pada lempeng silika gel dan dimasukkan ke dalam lempeng ke dalam chamber yang telah dijenuhi dengan fase gerak metanol : asam formiat 10% (97 : 3). Lempeng KLT dielusi hingga batas (8 cm) dan dikeringkan. Bercak yang terbentuk diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, kemudian disemprot dengan pereaksi ferri klorida (FeCl_3) dan diamati secara visibel.

Senyawa Flavonoid

Sampel ekstrak etanol daun karika ditimbang sebanyak 50 mg, ditambahkan dengan 10 mL asam klorida 4 N. larutan sampel dihidrolisis dengan cara direfluk menggunakan pendingin balik selama 30 menit. Larutan sampel dinginkan dan diekstraksi dengan 5 mL larutan dietil eter. Fase dietil eter diambil dan diuapkan dengan gas nitrogen. Sampel dan pembanding ditotolkan sebanyak 10 μ L pada lempeng silika. Lempeng KLT dimasukkan ke dalam chamber yang telah jenuh dengan fase gerak butanol : asam asetat : air (3:1:1) serta dielusik hingga batas (8 cm). Lempeng KLT dikeringkan. Bercak diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm serta diuapi dengan uap amoniak dan diamati secara visibel.

Analisa Data

Data hasil uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH adalah nilai absorbansi yang terbaca pada alat spektrofotometer UV-Vis. Nilai absorbansi dari sampel atau baku pembanding vitamin C dibandingkan dengan nilai absorbansi kontrol (absorbansi larutan DPPH 0,1 nM). Persentase aktivitas antioksidan dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs perlakuan}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs kontrol : Absorbansi larutan DPPH 0,1 mM

Abs perlakuan : Absorbansi seri konsentrasi ekstrak etanol daun karika atau baku pembanding vitamin C

Potensi antioksidan dari ekstrak etanol daun karika dan vitamin C dinyatakan sebagai nilai IC_{50} diperoleh dengan menggunakan analisis probit pada taraf kepercayaan 95%. Nilai logaritma konsentrasi larutan uji (ekstrak etanol daun karika atau vitamin C) diposisikan sebagai variabel bebas (X) dan nilai persentase antioksidan sebagai variabel tergantung (Y).

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Karika dan Vitamin C dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan dalam penelitian dilakukan menggunakan metode DPPH. DPPH merupakan radikal bebas sintetik berwarna ungu yang banyak digunakan dalam uji aktivitas antioksidan. Pengujian antioksidan pada penelitian ini menggunakan perbandingan 1 : 1, yang artinya 2 mL DPPH dicampurkan dengan 2 mL larutan sampel (ekstrak etanol daun karika atau vitamin C). Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun karika serta vitamin C dan nilai IC_{50} dapat dilihat pada tabel I.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel ekstrak etanol daun karika ataupun pembanding vitamin C yang digunakan diikuti dengan semakin meningkatnya aktivitas antioksidannya. Hal tersebut dikarenakan pada konsentrasi yang tinggi, kemampuan antioksidan untuk menangkap radikal bebas semakin besar. Konsentrasi DPPH yang masih ada semakin kecil sehingga nilai absorbansi yang dihasilkan akan semakin turun.

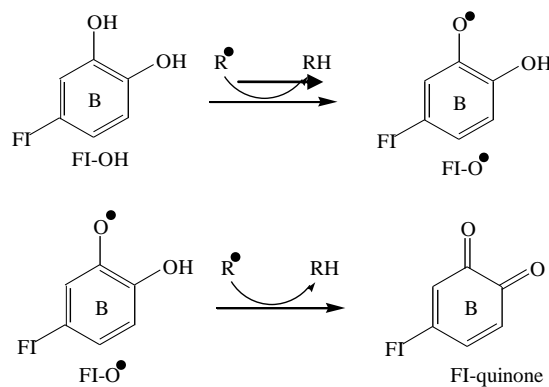
Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun karika adalah sebesar 30,8 ppm dan vitamin C sebesar 2,8 ppm. Nilai IC_{50} tersebut <50 ppm (aktivitas antioksidan sangat kuat) (Blois, 1958). Semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin besar daya antioksidannya. Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun karika lebih besar dari nilai IC_{50} vitamin C, berarti menunjukkan potensi antioksidan vitamin C lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol daun karika. Hal ini dikarenakan dalam ekstrak etanol daun

karika masih dalam bentuk campuran dari beberapa senyawa yang tidak memiliki aktivitas antioksidan. Sementara itu, vitamin C merupakan senyawa sintesis murni yang telah dibuktikan poten sebagai antioksidan. Vitamin C juga memiliki gugus hidroksil lebih banyak, sehingga vitamin C dapat mendonorkan atom hidrogen lebih banyak untuk bereaksi dengan radikal bebas DPPH.

Tabel I. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Karika dan Vitamin C

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas antioksidan (%)	Nilai Probit	Persamaan Probit dan nilai IC ₅₀
Ekstrak etanol daun karika	2,5	17,771	0,145	y = 0,322x + 0,006 r = 0,997 IC₅₀ = 30,790
	5	20,517	0,222	
	10	26,440	0,318	
	15	35,272	0,381	
	20	45,180	0,428	
	25	50,350	0,465	
Vitamin C	0,5	22,025	0,190	y = 0,4052x + 0,3061 r = 0,998 IC₅₀ = 2,857
	1	24,610	0,298	
	1,5	36,564	0,373	
	2	42,488	0,429	
	2,5	50,458	0,473	

Larutan radikal bebas DPPH memiliki atom nitrogen yang tidak berpasangan. Reaksi DPPH dengan atom hidrogen yang terdapat pada antioksidan dapat membuat larutan DPPH menjadi berkurang reaktivitasnya, yang dapat ditunjukkan dengan memudarnya warna ungu menjadi kuning (Molyneux, 2004). Uji aktivitas antioksidan ini menunjukkan bahwa senyawa aktif yang terdapat dalam ekstrak etanol daun karika mampu menangkal radikal bebas difenilpicrilhidrazil dengan cara mendonorkan atom hidrogen sehingga berubah menjadi difenilpicrilhidrazilin yang bersifat non radikal. Adapun mekanisme reaksi peredaman radikal bebas dapat dilihat pada Gambar 1:



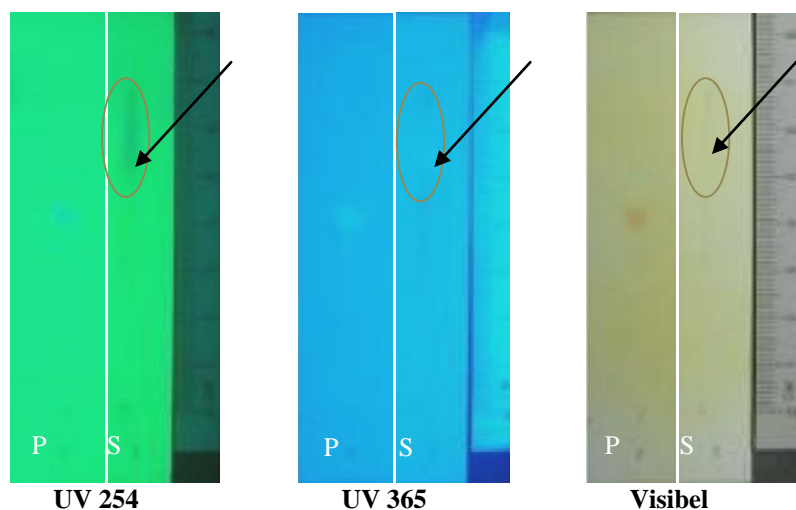
Gambar 1. Reaksi penangkapan radikal bebas oleh senyawa flavonoid (Pietta, 2000)

Identifikasi senyawa aktif dengan metode KLT

Identifikasi alkaloid

Silika G60 F₂₅₄ dipilih sebagai fase diam karena baik untuk memisahkan senyawa alkaloid (Sastrohamidjojo, 2005). Senyawa alkaloid standar yang digunakan adalah kuinin. Harborne (1996) menyatakan bahwa bercak senyawa alkaloid pada plat KLT akan berwarna coklat jingga berlatar belakang kuning setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff. Pengamatan bercak di

bawah sinar UV 254 nm menghasilkan bercak yang mampu meredam fluoresensi silica gel dan bercak berfluoresensi biru di bawah sinar UV 366 nm (gambar 2). Identifikasi alkaloid pada pengamatan secara visibel diperoleh bercak pembanding dan sampel berwarna kuning orange dengan latar belakang kuning. Berdasarkan hasil tersebut, sampel ekstrak etanol daun karika positif mengandung senyawa alkaloid dengan harga *Retardation factor* (Rf) sebesar 0,65. Harga Rf senyawa standar kuinin adalah 0,47. Hal ini menunjukkan bahwa kuinin lebih polar daripada sampel senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol daun karika.



Keterangan:	<p>UV 254 Fase diam : silika gel 60 F₂₅₄ Fase gerak : metanol : amonia (100:1,5) Penampak bercak : Dragendorff Warna spot pada visibel : kuning orange Rf ekstrak etanol : 0,65 Rf pembanding : 0,47 P : pembanding kuinin S : ekstrak etanol daun karika</p>	<p>UV 365</p>	<p>Visibel</p>
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------	-----------------------

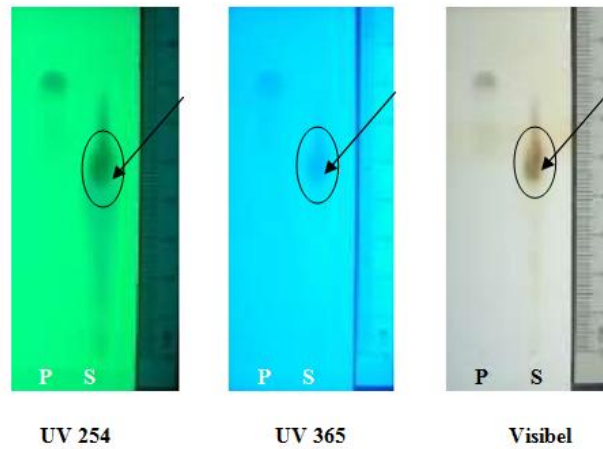
Gambar 2. Kromatogram identifikasi senyawa alkaloid dalam ekstrak etanol daun karika

Senyawa Fenol

Senyawa fenol menyerap sinar di daerah UV pendek dan dapat dideteksi pada lempeng silika gel yang mengandung indikator fluoresensi gelombang 254 nm. Senyawa fenol akan terlihat sebagai bercak gelap dengan latar belakang berfluoresensi (Harborne, 1996). Bercak sampel dan pembanding yang dilihat secara visibel pada identifikasi senyawa fenol berwarna hitam kelabu dan pada sinar UV 254 nm berwarna hitam kelabu dengan latar belakang berfluoresensi (gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa sampel ekstrak etanol daun karika mengandung senyawa fenol. Nilai Rf bercak sampel adalah sebesar 0,55; sedangkan nilai Rf pembanding asam galat adalah 0,84. Hasil ini menandakan bahwa senyawa fenol dalam sampel ekstrak etanol daun karika lebih bersifat polar dari pembanding asam galat.

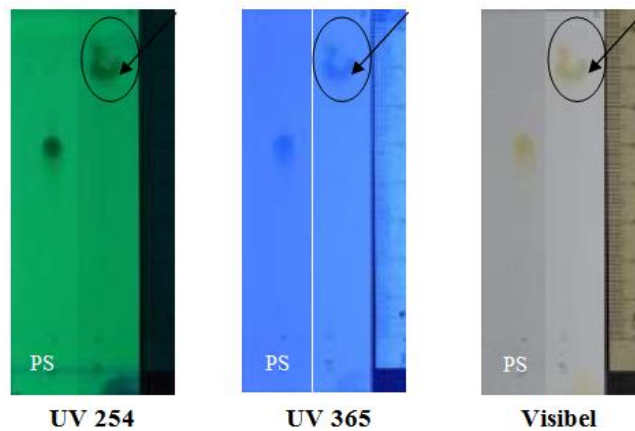
Senyawa flavonoid

Wagner (2001) menyatakan bahwa flavonoid dapat berpendar dan memberikan warna kuning, hijau ataupun biru. Hasil identifikasi menunjukkan bercak sampel di bawah sinar UV 254 nm dapat berpendar dan berwarna kuning, sedangkan pada pada pengamatan di bawah sinar UV 365 nm bercak berfluoresensi biru. Bercak sampel dan pembanding rutin berwarna kuning pada pengamatan secara visibel. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa sampel ekstrak etanol daun karika positif mengandung flavonoid. Harga Rf bercak sampel sebesar 0,82 dan pembanding sebesar 0,56. Hal ini menunjukkan bahwa pembanding rutin lebih bersifat polar daripada senyawa flavonoid yang ada dalam ekstrak etanol daun karika.



Keterangan: Fase diam : silika gel 60 F₂₅₄
 Fase gerak : metanol : asam formiat 10% (95:5)
 Penampak bercak : ferri klorida
 Warna spot pada visibel : hitam
 Rf sampel uji : 0,55
 Rf pembanding : 0,84
 P : pembanding asam gallat
 S : ekstrak etanol daun karika

Gambar 3. Kromatogram identifikasi senyawa fenol dalam ekstrak etanol daun karika



Keterangan: Fase diam : silika gel 60 F₂₅₄
 Fase gerak : butanol : asam asetat : air (3:1:1)
 Penampak bercak : amoniak
 Warna spot pada visibel : kuning
 Rf ekstrak etanol : 0,82
 Rf pembanding : 0,56
 P : pembanding rutin
 S : ekstrak etanol daun karika

Gambar 4. Kromatogram identifikasi senyawa fenol dalam ekstrak etanol daun karika

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Nilai IC₅₀ yang diperoleh dari ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) adalah sebesar 30,8 ppm, dan vitamin C sebesar 2,8 ppm. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun karika (*Carica pubescens*) adalah senyawa alkaloid, fenol dan flavonoid.

Saran

Perlu dilakukan isolasi terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam daun karika yang memiliki aktifitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Blois M.S., 1958, Antioxidant Determination by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, **181**, 1199-1200
- Fatchurrozak, Suranto dan Sugiyarto, 2013, Pengaruh Ketinggian Tempat Terhadap Kandungan Vitamin C dan Zat Antioksidan pada Buah *Caricapubescens* di Dataran Tinggi Dieng, *Jurnal EL-VIVO*, **1**(1), 15-22
- Harborne J.B., 1996, *Metode Fitokimia*, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung
- Hidayat S., 2001, Prospek Pepaya Gunung (*Carica pubescens*) dari Sikunang, Pegunungan Dieng, Wonosobo. *Prosiding Seminar Sehari: Menggali Potensi dan Meningkatkan Prospek Tanaman Holtikultura Menuju Ketahanan Pangan*, Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor-LIPI, Bogor
- Laily A.N., Suranto, Sugiyarto, 2012, Characterization of *Carica pubescens* in Dieng Plateau, Central Java based on Morphological Characters, Antioxidant Capacity, and Protein Banding Pattern, *Jurnal Nusantara Bioscience*, **4**(1), 16-21
- Molyneux P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Technol.*, **26**(2), 211-219
- Pietta P.G., 2000, Flavonoids as Antioxidants, *J. Nat. Prod.*, **63**(7), 1035-1042
- Novalina D., 2013, Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Carica pubescens* dari Dataran Tinggi Dieng terhadap Bakteri Penyebab Diare, *Tesis*, Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Sastrohamidjojo H., 2005, *Kromatografi*, Edisi Kedua, Cetakan Ketiga, Liberty, Yogyakarta
- Tjay T.H., dan Raharja K., 2010, Enzyme-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review *BioResource*, **1**(24), 707-738
- Wagner H. and Bladt, S., 2001, *Plant Drugs Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, Second edition. New York: Springer Verlag Berlin Heidenberg
- Winarsi H., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta