

Flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.)

Antioxidant-free radical scavenging of flavonoid from The Leaves of *Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.

Titik Sunarni ^{1*)}, Suwidjiyo Pramono ²⁾ dan Ratna Asmah ²⁾

¹⁾ Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta

²⁾ Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Abstrak

Telah dilakukan uji aktivitas antioksidan penangkap radikal terhadap isolat flavonoid dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol*). Ekstrak air daun dipekatan kemudian disuspensikan dalam etanol untuk mendapatkan fraksi etanolik. Selanjutnya dilakukan kromatografi kertas berulang hingga diperoleh isolat murni secara kromatografi. Semua isolat diidentifikasi dengan kromatografi kertas, kecuali isolat B_{4b} dilanjutkan identifikasi dengan spektrofotometer UV-Vis, FT-IR and ¹H-NMR. Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode penangkapan radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl).

Semua isolat flavonoid menunjukkan aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH. Isolat B_{4b} mempunyai aktivitas paling kuat dengan nilai EC₅₀ 6.43 µg/mL. Hasil identifikasi menunjukkan isolat B_{4b} sebagai flavon dengan gugus hidroksi pada C-3, C-7, C-3', C-4' and metil pada C-5.

Kata kunci : *Stelechocarpus burahol*, flavonoid, antioksidan, DPPH

Abstract

The activity testing of flavonoid compounds as antioxidant and as scavenger of free radical, isolated from the *Stelechocarpus burahol* leaves had been performed. The aqueous extract of the leaves was concentrated and then suspended in ethanol to produce ethanolic fraction. The fraction was chromatographed on several paper chromatography systems to produce isolate with chromatographic purity. The all isolated flavonoid was identified by paper chromatography system. Especially, the B_{4b} isolate were identified further using spectrometer UV-Vis, FT-IR and ¹H-NMR. Their antioxidant activities were done by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging method.

The all isolated flavonoid showed activity as DPPH scavenger. Among these isolate, B_{4b} exhibited a strong free radical scavenging with an EC₅₀ value of 6.43 µg/mL. They were identified and B_{4b} isolate was presumed as flavon with hydroxyl group on C-3, C-7, C-3', C-4' and methyl on C-5.

Key words : *Stelechocarpus burahol*, flavonoid, antioxidant, DPPH

Pendahuluan

Perkembangan pengetahuan menunjukkan hubungan antara kimiawi radikal dengan keterlibatannya pada proses biologi normal ataupun pada beberapa penyakit yang

dihubungkan dengan ketuaan. Stres oksidatif, yang diinduksi oleh radikal, diketahui sebagai salah satu faktor penyebab penyakit degeneratif.

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain.

Tubuh tidak mempunyai sistem pertahanan antioksidatif yang berlebihan, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih tubuh membutuhkan antioksidan eksogen. Kekhawatiran terhadap efek samping antioksidan sintetik (Rohdiana, 2001) maka antioksidan alami menjadi alternatif yang terpilih.

Antioksidan alami mampu melindungi tubuh terhadap kerusakan yang disebabkan spesies oksigen reaktif, mampu menghambat penyakit degeneratif serta mampu menghambat peroksidasi lipid pada makanan. Beberapa tahun terakhir terjadi peningkatan minat untuk mendapatkan antioksidan alami. Studi menunjukkan senyawa fenolik seperti flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal (Cos *et al.*, 2001; Gulcin *et al.*, 2004).

Stelechocarpus burabol atau dikenal dengan nama kepel secara tradisional digunakan sebagai obat untuk menurunkan kadar asam urat dan diuretik. Sutomo (2003) melaporkan fraksi tidak larut petroleum eter dari ekstrak metanol daun kepel mampu menurunkan kadar asam urat dan hasil identifikasi menunjukkan adanya flavonoid. Menurut Cos *et al.*, (1998) aktivitas flavonoid sebagai penurun kadar asam urat melalui penghambatan enzim xantin oksidase dari beberapa flavonoid selain dapat menghambat enzim xantin oksidase juga bersifat sebagai antioksidan penangkap radikal superoksida.

Sebagai upaya pencarian antioksidan alami, maka telah dilakukan penelitian kandungan flavonoid antioksidan penangkap radikal dari daun kepel. Potensi antioksidan penangkap radikal ditentukan menggunakan DPPH, suatu radikal stabil dalam larutan air atau metanol dan mampu menerima sebuah elektron atau radikal hidrogen untuk menjadi molekul diamagnetik yang stabil (Oke *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2002). DPPH pada uji ini ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH-H tereduksi. Warna berubah dari violet menjadi kuning dan diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang 517 nm. Adanya penurunan serapan tersebut maka aktivitas antioksidan penangkap radikal dapat diketahui.

Metodologi

Bahan

Daun kepel diambil dari Desa Karangbungan Matesih Karanganyar saat tanaman berbunga pada bulan Agustus 2004. Determinasi dilakukan oleh Laboratorium Morfologi & Sistematika Tumbuhan Universitas Setia Budi. Pelarut organik dan bahan pereaksi yang digunakan berderajat pro analisis.

Pembuatan fraksi etanolik

Serbuk daun kering 120 g direbus dalam panci infus dengan 1,32 L air selama 15 menit pada suhu 90°C kemudian disaring panas. Sari diuapkan di atas penangas air sampai kental kemudian ditambah etanol absolut sampai terjadi padatan kembali. Filtrat disaring dan dipekatkan dengan penguap vakum, selanjutnya disebut fraksi etanolik.

Isolasi flavonoid antioksidan penangkap radikal

Sebanyak 9 g fraksi etanolik dilarutkan dalam metanol dan ditotolkan pada kertas kromatografi Toyo no.51 membentuk garis. Kertas dikembangkan dengan fase gerak air kemudian dilanjutkan asam asetat 10%. Diperoleh dua bercak positif dengan uap amonia dan DPPH, yaitu bercak A dan B. Bagian kertas yang mengandung bercak A dan B dipotong membentuk pita-pita kertas. Masing-masing potongan direndam dalam metanol sambil digojok semalam kemudian disaring dengan kertas Whatman no 42. Filtrat diuapkan dan disimpan dalam eksikator hingga kering, diperoleh fraksi A (150 mg) dan fraksi B (180 mg).

Fraksi A di kromatografi pada kertas Toyo no. 51 menggunakan fase gerak jenuh air dari toluena-*n*-butanol-asam asetat diperoleh isolat A₁ (80 mg). Kromatografi isolat B menggunakan fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1) dengan dua kali pengembangan diperoleh bercak B₂, B₃, dan B₄. Hasil perendaman bercak B₂ di kromatografi menggunakan silika gel GF₂₅₄ menggunakan fase gerak jenuh air dari toluena-*n*-butanol-asam asetat dan diperoleh isolat B₂ (30 mg). Filtrat hasil perendaman bercak B₃ dilakukan kromatografi kertas fase gerak *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1) diperoleh isolat B₃ (8 mg). Bercak B₄ direndam dalam metanol-air (4:6) dan filtrat direfluk dengan asam klorida 2N 60 menit. Filtrat hasil refluk dipartisikan dengan 150 mL eter sebanyak 3 kali. Bagian eter diuapkan dan di kromatografi kertas dengan *n*-butanol-asam asetat-air (3:1:1). Kromatogram yang diperoleh menunjukkan dua bercak, B_{4a} dan B_{4b}. Potongan pita kedua bercak tersebut direndam dalam metanol dan selanjutnya filtrat diuapkan hingga kering dan diperoleh isolat B_{4a} (10 mg) dan B_{4b} (17 mg).

Penentuan golongan flavonoid

Kromatografi kertas digunakan untuk penentuan golongan flavonoid dari fraksi dan isolat yang diperoleh. Deteksi bercak dilakukan dibawah sinar UV366 dengan pendeteksi uap ammonia dan sitroborat. Deteksi aktivitas antioksidan dari bercak kromatografi dengan DPPH 0,2% dalam metanol. Kemurnian ditetapkan secara kromatografi lapis tipis fase diam silika gel GF254 dan kromatografi kertas menggunakan 4 jenis fase gerak yang berbeda polaritasnya.

Uji aktivitas antioksidan penangkap radikal

Semua isolat yang diperoleh dari hasil pemisahan secara kromatografi (isolat A₁, B₂, B₃, B_{4a} dan B_{4b}) dilakukan uji aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH sesuai metode Kwon dan Kim (2003) dengan sedikit modifikasi. Larutan isolat dalam metanol pada beberapa konsentrasi (1-32 µg/mL) sebanyak 1,2 mL ditambah 0,3 mL larutan DPPH 0,5 mM dalam metanol 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: $(A_{\text{blanko}} - A_{\text{sampel}}) : A_{\text{blanko}} \times 100 \%$. Data aktivitas (%) dianalisis dan dihitung nilai EC₅₀ melalui analisis probit. EC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% DPPH. Pengujian dilakukan dengan empat kali replikasi.

Identifikasi isolat

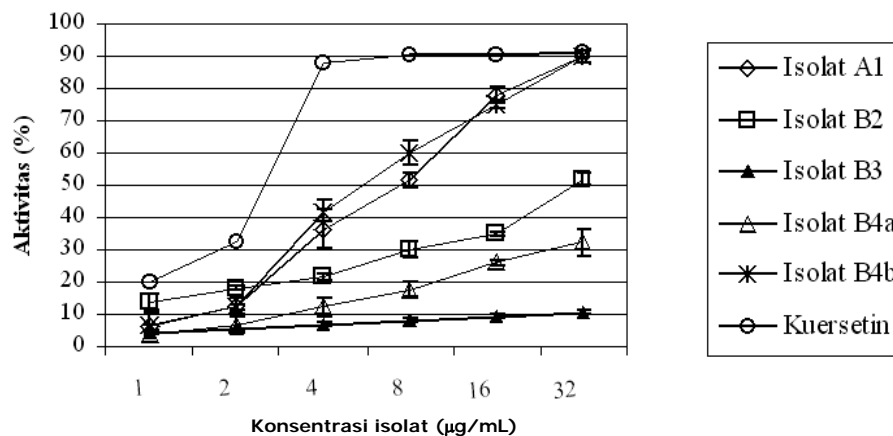
Isolat A₁, B₂, B₃, B_{4a} dan B_{4b} diidentifikasi berdasarkan data kromatogram. Khusus untuk isolat B_{4b} identifikasi dilengkapi dengan data spektrum ultraviolet menggunakan pereaksi geser berdasarkan metode Markham (1988) dan Mabry *et al.* (1970), spektrum FT-IR dalam *pellet* KBr dan spektrum ¹H-NMR 90 MHz dalam DMSO-*d*₆.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil uji aktivitas isolat sebagai antioksidan penangkap radikal

Aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH masing-masing isolat menunjukkan bahwa isolat A₁ dan B_{4b} mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal yang relatif lebih tinggi dibandingkan ketiga isolat yang lain (Gambar 1). Kedua isolat tersebut pada konsentrasi 32 µg/mL mempunyai aktivitas penangkap radikal lebih dari 90%. Tiga isolat yang lain pada konsentrasi sama menunjukkan aktivitas yang lebih rendah. Isolat B₃ dan B_{4a} pada konsentrasi larutan uji 32 µg/mL bahkan belum mampu menangkap 50% radikal DPPH.

Berdasarkan profil data yang diperoleh, maka hanya isolat yang pada rentang kadar 1-32 µg/mL mampu menunjukkan aktivitas lebih dari 50 % saja yang dihitung nilai EC₅₀, sedangkan isolat yang pada rentang kadar tersebut diatas menunjukkan aktivitas kurang dari 50% tidak dilakukan ekstrapolasi. Hasil pengujian menunjukkan isolat B_{4b} mempunyai potensi antioksidan penangkap radikal dengan



Gambar 1. Aktivitas antioksidan penangkap radikal dari isolat

EC₅₀ 6,43 µg/mL. Aktivitas isolat B_{4b} yang paling tinggi dibandingkan keempat isolat yang lain meskipun dengan isolat A₁ selisih nilai EC₅₀ hanya sebesar 0,42 µg/mL. Aktivitas antioksidan isolat B₂ lebih rendah dibandingkan A₁ dan B_{4b}. Dua isolat yang kurang aktif sebagai antioksidan penangkap radikal adalah isolat B₃ dan B_{4a}. Nilai EC₅₀ masing-masing isolat terlihat pada Tabel I.

Perbedaan aktivitas ini kemungkinan disebabkan masing-masing isolat yang diduga flavonoid tersebut mempunyai gugus hidroksi dengan jumlah dan lokasi pada kerangka flavonoid yang berbeda. Gulcin *et al.* (2004) dan Pokorni *et al.*, (2001) menyatakan bahwa aktivitas antioksidan dari senyawa alamiah yang berasal dari tanaman seperti flavonoid disebabkan adanya gugus hidroksi pada struktur molekulnya. Flavonoid dengan gugus hidroksi bebas mempunyai aktivitas penangkap radikal dan adanya gugus hidroksi lebih dari satu terutama pada cincin B akan meningkatkan aktivitas antioksidannya.

Hasil identifikasi isolat

Hasil identifikasi isolat A₁, B₂ dan B₃ pada kromatografi kertas memberikan data tercantum pada Tabel II. Masing-masing isolat setelah hidrolisis menghasilkan bercak dengan nilai *bRf* yang berbeda dengan isolat awalnya. Hal ini menunjukkan ketiga isolat tersebut merupakan O-glikosida. Warna biru terang isolat A₁ dibawah sinar UV 366 nm dan menjadi biru kehijauan setelah diberi uap amoniak kemungkinan suatu flavon, flavanon tanpa 5-OH atau flavonol tanpa 5-OH tetapi tersubstitusi pada 3-OH. Warna bercak isolat B₂ dan B₃ berwarna ungu gelap dibawah sinar UV 366 nm dan setelah diberi uap amoniak menjadi coklat kemungkinan suatu 5-OH flavon, flavanon atau flavonol (tersubstitusi pada 3OH).

Isolat B_{4a} dan B_{4b} merupakan hasil hidrolisis karena pada saat pemisahannya dengan kromatografi kertas isolat tidak dapat larut dalam metanol sehingga digunakan metanol-air (4 : 6) kemudian filtrat yang

Tabel I. Nilai EC₅₀ hasil pengujian aktivitas antioksidan isolat

No.	Jenis larutan uji	EC ₅₀ (µg/ml)
1.	Isolat A ₁	6,85
2.	Isolat B ₂	22,90
3.	Isolat B ₃	> 32,00
4.	Isolat B _{4a}	> 32,00
5.	Isolat B _{4b}	6,43
6.	Kuersetin (kontrol positif)	2,15

Tabel II. Data kromatogram hasil kromatografi kertas isolat A₁, B₂ dan B₃

No	Data bercak	Sebelum hidrolisis	Sesudah hidrolisis
1	Isolat A ₁ <i>bRf</i> /BAA (4 : 1 : 5) <i>bRf</i> /HAc UV 366 nm NH ₃ / UV 366 nm	68	92
		75	69
		Biru terang	ungu lemah
		Hijau kebiruan	Kuning kehijauan
2	Isolat B ₂ <i>bRf</i> /BAA (4 : 1 : 5) <i>bRf</i> /HAc UV 366 nm NH ₃ / UV 366 nm NH ₃ vis	Kuning	Kuning lemah
		69	93
		61	7
		Ungu gelap	Kuning terang
3	Isolat B ₃ <i>bRf</i> /BAA (4 : 1 : 5) <i>bRf</i> /HAc UV 366 nm NH ₃ /UV 366 nm NH ₃ vis	Coklat	Kuning terang
		Kuning	Kuning
		72	92
		62	4
		Ungu gelap	Kuning pucat
	Coklat gelap	Kuning pucat	
	NH ₃ vis	Kuning	Kuning lemah

Tabel III. Data kromatogram hasil kromatografi kertas isolat B_{4a} dan B_{4b}

No	Bahan	Data bercak	Sesudah hidrolisis
1	Isolat B _{4a}	<i>bRf</i> /BAA 4 : 1 : 5	93
		<i>bRf</i> /HAc	5
		UV 366 nm	Kuning
		NH ₃ / UV 366 nm	Kuning
		NH ₃ vis	Kuning
2	Isolat B _{4b}	<i>bRf</i> /BAA 4 : 1 : 5	83
		<i>bRf</i> /HAc	7
		UV 366 nm	Kuning
		NH ₃ /UV 366 nm	Kuning
		NH ₃ vis	Kuning

Tabel IV. Panjang gelombang spektrum UV isolat B_{4b} dan penafsirannya.

Pelarut/ pereaksi	λ maks (nm)		Pergeseran λ maks (nm)		Penafsiran
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
MeOH	368	254 290 <i>sb</i>			Flavonol 3-OH
NaOH	434	286	66 (turun terus)*		3,4'-diOH
NaOAc	394	274	26 (turun terus)*	20	7-OH; 3,4'-diOH
NaOAc + H ₃ BO ₃	380	266	12		3'4'-diOH
AlCl ₃ + HCl	440	270	60		3-OH dengan <i>o</i> -diOH
AlCl ₃	428	264	72		3-OH tanpa 5-OH

Keterangan : *sb* : bahu * : intensitas

diperoleh dihidrolisis. Data kromatogram isolat B_{4a} dan B_{4b} tercantum pada Tabel III. Nilai *bRf* bercak hasil pengembangan dengan asam asetat 15% dan BAA (4:1:5) mencerminkan bahwa kedua isolat suatu aglikon. Karakteristik bercak kromatogram kedua isolat di bawah sinar ultraviolet menunjukkan warna kuning dan setelah diuapi amoniak tidak menunjukkan perubahan warna, kemungkinan suatu flavonol 3-OH.

Identifikasi isolat B_{4b} yang menunjukkan aktivitas antioksidan paling tinggi dilanjutkan menggunakan spektrofotometer UV, FT-IR dan ¹H-NMR dengan hasil pada Tabel IV, V dan VI. Berdasarkan identifikasi menggunakan nilai *bRf*, warna bercak di bawah UV 366 nm sebelum dan setelah diberi uap amoniak serta data spektrum ultraviolet, infra merah dan ¹H-NMR maka disimpulkan isolat B_{4b} adalah 3,7,3',4'-tetrahidroksi-5-metil flavon.

Tingginya aktivitas antioksidan B_{4b} dibanding isolat lainnya kemungkinan adanya gugus *o*-diOH dan 3-OH bebas. Hal ini sesuai dengan Cos *et al.* (1998) yang menyatakan keberadaan gugus 3-OH dan 3'-OH pada cincin B dapat dihubungkan dengan aktivitas antioksidan penangkap radikal yang tinggi. Adanya gugus hidroksi pada cincin B dari isolat B_{4b} merupakan sisi aktif utama dalam memutus rantai oksidasi dan gugus hidroksi ganda pada cincin B lebih meningkatkan aktivitasnya.

Tabel V. Data spektrum FT-IR isolat B_{4b} dalam *pellet* KBr

Daerah serapan (cm ⁻¹)	Penafsiran gugus
3413,8	OH
2920,0 dan 2850	C-H alifatis
1608,5	C=O
1461,9	C=C
1377,1	CH ₃

Tabel VI. Data spektrum ¹H-NMR (90 MHz) isolat B_{4b} dalam DMSO-*d*₆

δ (ppm)	Puncak	Penafsiran	Penafsiran struktur dari spektrum UV, FT-IR, ¹ H-NMR
1,2	singlet	CH ₃	
6,2 - 6,4	doublet	proton C6 dan C8	
6,8 - 6,9 (<i>J</i> =9Hz)	doublet	proton C-5' (<i>ortho</i>)	
7,8 ppm	singlet	proton C-2', C-6'	

Kesimpulan

Diperoleh 5 isolat dari daun *S. burabol*. Semua isolat mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal dan B_{4b} merupakan isolat

paling aktif dengan EC₅₀ 6,43 µg/mL. Identifikasi B_{4b} menunjukkan 3,7,3',4'-tetrahidroksi-5-metil flavon.

Daftar Pustaka

- Cos ,P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Poel, B.V., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Berghe, D.V., 1998, Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers, *J.Nat. Prod.*, 61 : 71-76.
- Cos, P., Calomme, M., Sindambiwe, J.B., Bruyne, T.D., Cimanga, K., Pieters, L., Vlietinck, A.J., and Berghe, D.V., 2001, Cytotoxicity and Lipid Peroxidation-Inhibiting Activity of Flavonoids, *Planta Med.*, 67 : 515-519.
- Gulcin, I., Uguz, M.T., Oktay, M., Beydemir, S., and Kufrevioglu, O.I., 2004, Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Clary Sage (*Salvia sclarea* L.), *Turk I. Agric. For.*, 28: 25-33.
- Hou, W.C., Hsu, F.L. and Lee, M.H., 2002., Yam (Dioscorea batatas) Tuber Mucilage Exhibited Antioxidant Activities *in vitro*, *Planta Med.*, 68: 1072 – 1076.
- Kwon, Y.S., and Kim, C.M., 2003, Antioxidant Constituents from the Stem of *Sorghum bicolor*, *Arch. Pharm. Res.*, 26 (7) : 535 – 539.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. and Thomas, M.B., 1970, *The Systematic Identification of Flavonoid*, pp. 1-343, Springe-Verlag, New York.
- Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, 1-103. terjemahan Kosasih Padmawinata, Bandung, Penerbit ITB.
- Oke, J.M. and Hamburger, M.O., 2002, Screening of Some Nigerian Medicinal Plants For Antioxidant Activity Using 2,2, Diphenyl-Picryl-Hydrazyl Radical, *AJBR*, 5 : 77-79.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N. and Gordon, M., 2001, *Antioxidants in Food, Practical Applications*, 1-123, Wood Publishing Limited, Cambridge, England.
- Rohdiana, D., 2001, Radical Scavengers Activity of Tea Polyphenol, *Majalah Farmasi Indonesia*, 12(1) : 53 – 58.
- Sutomo, 2003, Penurunan asam urat darah ayam jantan *Braille hiperurisemia* oleh fraksi ekstrak metanol daun kepel (*Stelechocarpus burabol*, Hook f. & Th.), *Tesis*, Pasca Sarjana, Prodi Ilmu Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

* Korespondensi : Titik Sunarni, M.Si., Apt.
 Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
 Jl. Letjen Sutoyo Mojosongo - SOLO, - 57127,
 Telp. 0271-852518, HP:08121520941
 E-mail: farmasi_usbsolo@yahoo.co.id.