

## Senyawa Antioksidan dari Ekstrak n-Heksana Daun Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) dari Banyuwangi, Garut - Indonesia

\*Irda Fidrianny, Ellis Siti Zahidah, Rika Hartati

Kelompok Keilmuan Biologi Farmasi, Sekolah Farmasi – Institut Teknologi Bandung

### Abstrak

Pada proses metabolisme tubuh radikal bebas terbentuk secara alami, dalam jumlah tertentu diperlukan tubuh karena merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh. Jika tubuh terpapar radikal bebas berlebihan dan terus menerus dapat menyebabkan kerusakan sel bahkan kematian sel. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Berdasarkan beberapa penelitian, daun asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) diketahui memiliki efek antioksidan. Selain itu, daun asam Jawa telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan berbagai ekstrak daun asam Jawa dengan DPPH, menetapkan  $IC_{50}$  peredaman DPPH, menetapkan kadar fenol total, flavonoid total, karotenoid total dari masing-masing ekstrak, menganalisis korelasi fenol total, flavonoid total, dan karotenoid total terhadap aktivitas peredaman DPPH dan mengisolasi senyawa aktif antioksidan dari ekstrak daun asam Jawa. Simplisia daun asam Jawa diekstraksi dengan refluks menggunakan tiga pelarut dengan kepolaran meningkat yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Dilakukan pemantauan pada setiap ekstrak secara kromatografi lapis tipis (KLT). Uji aktivitas peredaman radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil),  $IC_{50}$  peredaman DPPH, penentuan flavonoid total, fenol total, karotenoid total dilakukan dengan spektrofotometri ultraviolet-sinar tampak dan analisis korelasinya dengan aktivitas peredaman DPPH menggunakan metode Pearson. Ekstrak n-heksana difraksinasi secara kromatografi cair vakum (KCV). Fraksi ke-4-5 selanjutnya dilakukan subfraksinasi secara kromatografi kolom. Subfraksi 31 dimurnikan dengan KLT preparatif dan dilakukan uji kemurnian secara KLT. Simplisia daun asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) mengandung flavonoid, fenol, terpenoid, steroid/triterpenoid. Ekstrak etanol daun asam Jawa (BJ ekstrak 1 % 0,81 g/mL) menunjukkan aktivitas peredaman DPPH tertinggi (66,74%) dengan  $IC_{50}$  peredaman DPPH 2,05  $\mu$ g/mL, fenol total 6,17 g GAE/100 g, flavonoid total 3,22 g QE/100 g, karotenoid total 0,35% g BE/100 g. Satu senyawa antioksidan E diperoleh dari ekstrak n-heksana. Aktivitas peredaman DPPH ekstrak etanol daun asam Jawa berbeda bermakna terhadap ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksana ( $p < 0.05$ ). Golongan fenol merupakan kontributor utama pada aktivitas antioksidan ekstrak daun asam Jawa dengan metode DPPH. Senyawa antioksidan E merupakan senyawa aglikon flavonol yang mempunyai -OH bebas pada C-3 dan diduga mempunyai -OH bebas pada cincin A dan atau B.

**Kata kunci:** antioksidan, DPPH, asam Jawa, daun, ekstrak n-heksana, isolat E

### Abstract

In metabolism process free radicals are formed naturally. The body needs a certain amount as a part of the body's defense system. If body is exposed by free radicals excessively and continuously can cause cell damage and even cell death. Antioxidant are compounds that can inhibit the oxidation reaction by binding to free radicals and highly reactive molecules. Based on several studies, tamarind (*Tamarindus indica* L.) leaves were known to have the effect of antioxidants. In addition, tamarind leaves have been used by people for treating various diseases. This research aimed to test the antioxidant activity of various extracts of tamarind leaves by DPPH method, determine  $IC_{50}$  DPPH scavenging activity, total phenolic, total flavonoids, total carotenoid of each extract, analyze their correlation with DPPH scavenging activity and isolation antioxidant compound of tamarind leaves extract. Crude drug of tamarind leaves was extracted by reflux apparatus using three solvents with increasing polarity, n-hexane, ethyl acetate and ethanol. Each extract were monitored by TLC,  $IC_{50}$  DPPH scavenging activity, total phenolic, total flavonoids, total carotenoid of each extracts by ultraviolet-visible spectrophotometry and their correlation with DPPH scavenging activity by Pearson method. N-hexane extract was fractionated by vacuum liquid chromatography. Then fractions 4-5 were subfractionated by column chromatography. Subfraction 31 was purified using preparative thin layer chromatography (TLC) and purity test was performed by TLC. Crude drug of tamarind (*Tamarindus indica* L.) leaves contained flavonoids, phenolic compound, terpenoids, steroids / triterpenoids. Ethanol extract of tamarind leaves (MW 1 % extract was 0.81 g / mL) showed the highest DPPH scavenging activity (66.74 % ) with  $IC_{50}$  of DPPH scavenging activity 2.05  $\mu$ g/mL. Total phenolic, flavonoid, carotenoid content were 6.17 g GAE/100 g, 3.22 g QE/100 g and 0.35 g BE/100 g, respectively. An antioxidant compound E was obtained from n-hexane extract. The antioxidant activity of ethanol extract significantly different with n-hexane extract and ethyl acetate extract ( $p < 0.05$ ). Phenolic compounds were the major contributor in tamarind leaves extract using DPPH assay. Antioxidant compound E was flavonol aglycone that had free -OH group in C-3 and expected had free -OH in ring A and or ring B.

**Keywords:** antioxidant, DPPH, tamarind, leaves, n-hexane extract, isolate E

\*Penulis korespondensi, e-mail: irda@fa.itb.ac.id.

## Pendahuluan

Radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Pada proses metabolisme tubuh radikal bebas terbentuk secara alami, dalam jumlah tertentu diperlukan tubuh karena merupakan bagian dari sistem pertahanan tubuh. Tetapi jika tubuh terpapar radikal bebas berlebihan dan terus menerus dapat menyebabkan kerusakan sel bahkan kematian sel. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan alami diperoleh dari sumber-sumber alami seperti tumbuhan, dan dapat tersebar di berbagai bagian tanaman seperti kayu, kulit, akar, daun, bunga, buah, biji, rimpang, dan serbuk (Winarsi 2007). Banyak penelitian yang telah dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan dari tanaman, salah satunya adalah asam Jawa.

Asam Jawa (*Tamarindus indica* L.) merupakan salah satu jenis tanaman yang banyak dijumpai di daerah tropis. Asam Jawa sudah biasa digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional. Daunnya digunakan sebagai rebusan. Bunga digunakan untuk tuberkulosis (TB), batuk darah, rematik, dan luka. Kulit biji digunakan untuk asma, demam, dan sariawan. Daging buah digunakan untuk menyembuhkan demam, kehilangan nafsu makan, keracunan alkohol, muntah, infeksi cacing, sakit kuning, mual dan muntah pada ibu hamil, asma, radang payudara dan campak. Biji digunakan untuk menangani gigitan ular dan luka (Soemardji 2007). Suatu penelitian membuktikan bahwa ekstrak metanol asam Jawa mempunyai aktivitas antibakteri (Selvi et al. 2011).

Dari hasil beberapa penelitian, daun asam Jawa diketahui mengandung berbagai golongan diantaranya terpenoid, fenol, flavonoid, dan asam-asam organik (Mun'im et al. 2009). Sehubungan dengan adanya kandungan senyawa golongan fenol dan flavonoid, maka daun asam Jawa diduga memiliki efek antioksidan. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi senyawa antioksidan dari daun asam Jawa. Senyawa yang diisolasi tersebut dapat dijadikan *marker* bagi daun asam Jawa.

## Percobaan

### Bahan

Serbuk simplisia daun asam Jawa (*Tamarindus indica* L), n-heksana, etil asetat, etanol, kloroform, metanol, etanol, kapas bebas lemak, beta karoten,

kuersetin, asam galat, pereaksi Folin-Ciocalteu, natrium karbonat, aluminium klorida, natrium asetat, aquades, silika gel H, silika gel 60, silika gel GF<sub>254</sub>, pereaksi 2,2 difenil-1-pikril hidrazil, bismuth subnirat, kalium iodida, raksa (II) klorida, amil alkohol, serbuk magnesium, besi (III) klorida, gelatin, formaldehida, natrium hidroksida, gliserin, asam borat, asam sitrat, kloral hidrat, asam sulfat, anhidrida asetat, asam format.

### Alat

Seperangkat alat *chromatotron*, labu bundar, *rotavapor* (Buchi *Rotavapor* R-124, Buchi *Waterbath* B-480, Buchi *Rotavapor* R-125, dan Buchi *Waterbath* B-491), seperangkat alat refluks, lampu UV (Desaga Sarstedt Gruppe dan CAMAG), spektrofotometer UV-sinar tampak (Hewlett Packard 8435), spektrofotometer inframerah (Jasco FT-IR-4200 type A).

### Pengumpulan, Determinasi, dan Pengolahan Tanaman Uji

Bahan berupa daun asam Jawa dikumpulkan dari Banyuwangi, Garut pada bulan November 2013. Determinasi tanaman dilakukan di *Herbarium Bandungense*, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Hasil determinasi menyatakan tanaman uji adalah *Tamarindus indica* L. Pengolahan bahan meliputi sortasi basah, pencucian, pengeringan dan penggilingan menjadi serbuk simplisia.

### Karakterisasi Serbuk Simplisia

Karakterisasi serbuk simplisia yang dilakukan meliputi karakterisasi makroskopik, penetapan kadar sari larut air dan kadar sari larut etanol.

### Penapisan Fitokimia Simplisia

Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan terhadap alkaloid, flavonoid, fenol, saponin, terpenoid, kuinon, tanin, dan steroid/triterpenoid.

### Ekstraksi dan Pemantauan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode refluks dengan pelarut yang kepolarannya meningkat yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Masing-masing ekstraksi diulang tiga kali. Simplisia diekstraksi dengan n-heksana. Ampas simplisia diekstraksi dengan pelarut etil asetat selanjutnya ampas simplisia diekstraksi dengan pelarut etanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotavapor*. Masing-masing ekstrak dipantau secara kromatografi lapis tipis (KLT). Penampak bercak yang digunakan adalah sinar UV  $\lambda$  254 nm, sinar UV  $\lambda$  366 nm, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% dalam metanol, dan

DPPH 0,2% dalam metanol.

### Penetapan Aktivitas Peredaman Radikal Bebas DPPH

Untuk mengetahui aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak dilakukan penetapan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH. Masing-masing ekstrak direaksikan dengan larutan DPPH 50 µg/mL dalam metanol (1:1), diinkubasi selama 30 menit, dan aktivitas peredaman DPPH diukur menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak (Blois 1958). Aktivitas peredaman DPPH diukur menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak pada  $\lambda$  516 nm. Metanol digunakan sebagai blanko. Larutan DPPH 50 µg/mL digunakan sebagai kontrol (Molyneux 2004).

### Penetapan IC<sub>50</sub> Peredaman DPPH

Selain dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak menggunakan DPPH (50 µg/mL: 50 µg/mL), dilakukan pula penentuan IC<sub>50</sub> DPPH yaitu konsentrasi ekstrak yang dapat meredam 50 % aktivitas DPPH. Ekstrak dengan beberapa seri konsentrasi digunakan untuk membuat kurva kalibrasi antara aktivitas peredaman DPPH (%) terhadap konsentrasi ekstrak (µg/mL). Asam askorbat digunakan sebagai pembanding dan dilakukan prosedur yang sama seperti ekstrak untuk menentukan IC<sub>50</sub> asam askorbat.

### Penetapan Fenol, Flavonoid, dan Karotenoid Total

Penetapan fenol total (TPC), flavonoid total (TFC), dan karotenoid total (TCC) dilakukan sebagai data pendukung dalam pemilihan ekstrak yang akan dilanjutkan pada tahap fraksinasi. Pertama, pada masing-masing ekstrak dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui adanya fenol, flavonoid, dan karotenoid. Terhadap ekstrak yang memberikan hasil penapisan positif terhadap fenol, flavonoid, dan karotenoid dilakukan penetapan fenol, flavonoid, dan karotenoid total.

Penetapan kadar fenol total dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak dengan cara mereaksikan sejumlah ekstrak dalam metanol-air (1:1) dengan pereaksi Folin-Ciocalteu 10% dan natrium karbonat 1M selama 15 menit. Absorbansi larutan uji diukur pada  $\lambda$  765 nm (Pourmorad *et al.* 2006). Blanko yang digunakan adalah pereaksi Folin Ciocalteu yang dicampur dengan natrium karbonat 1 M yang jumlahnya sama dengan perlakuan zat uji dan dilarutkan dengan metanol-air (1:1). Konsentrasi asam galat yang digunakan sebagai pembanding 60-150 µg/mL. Kadar fenol total ditentukan berdasarkan hasil

perhitungan dari persamaan regresi kurva kalibrasi asam galat dan dihitung sebagai galat ekuivalen per 100 g ekstrak (g GAE/100 g).

Penetapan flavonoid total dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-sinar tampak. Sejumlah ekstrak dalam etanol ditambah dengan AlCl<sub>3</sub> 10%, natrium asetat 1M, dan air suling. Larutan uji diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit, kemudian diukur absorbansinya pada  $\lambda$  415 nm (Chang *et al.* 2002). Blanko yang digunakan adalah AlCl<sub>3</sub> 10%, natrium asetat 1M, dan air suling dalam etanol 80% dengan jumlah yang sama pada perlakuan sampel. Pembanding yang digunakan adalah kuersetin dengan konsentrasi 20-100 µg/mL. Kadar flavonoid total ditentukan berdasarkan hasil perhitungan dari persamaan regresi kurva kalibrasi kuersetin dan dihitung sebagai kuersetin ekuivalen per 100 g ekstrak (g QE/100 g).

Uji penetapan karotenoid total dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Thaipong *et al.* (2006), dengan menggunakan pembanding beta karoten yang diukur absorbansinya pada panjang gelombang 470 nm. Konsentrasi beta karoten yang digunakan sebagai pembanding adalah 10-40 µg/mL. Karotenoid total dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi beta karoten dan dihitung sebagai beta karoten ekuivalen per 100 g ekstrak (g BE/100 g).

### Fraksinasi dan Pemantauan Fraksi

Ekstrak n-heksana daun asam Jawa difraksinasi dengan menggunakan kromatografi cair vakum (KCV) dengan fase diam silika gel H dan dielusi secara gradien menggunakan 11 kombinasi n-heksana dan etil asetat. Fraksi yang diperoleh dipantau secara KLT dengan fase gerak n-heksana-etil asetat (10:1) diamati di bawah sinar UV  $\lambda$  254 nm, UV  $\lambda$  366 nm, dan DPPH 0,2% dalam metanol.

### Subfraksinasi dan Pemantauan Subfraksi

Fraksi 4 dan 5 disubfraksinasi dengan kromatografi kolom klasik menggunakan eluen n-heksana. Subfraksi yang diperoleh dipantau secara KLT diamati di bawah sinar UV  $\lambda$  254 nm, UV  $\lambda$  366 nm, dan DPPH 0,2% dalam metanol.

### Pemurnian dan Uji Kemurnian

Subfraksi 31 dimurnikan secara KLT preparatif dengan fase gerak n-heksana dan etil asetat 10:1. Untuk mendapatkan pita senyawa yang diinginkan pinggir plat disemprot DPPH 0,2% kemudian dikerok dan diekstraksi dengan pelarut n-heksana. Pita hasil pemurnian kemudian dilakukan uji kemurnian menggunakan kromatografi lapis tipis

pengembangan tunggal dengan tiga fase gerak berbeda. Penampak bercak yang digunakan adalah  $H_2SO_4$  10% dalam metanol.

### Karakterisasi Isolat

Isolat dikarakterisasi secara kromatografi lapis tipis dengan penampak bercak spesifik, spektrofotometri UV-sinar tampak, kromatografi kertas dua dimensi dan spektrofotometri inframerah.

### Hasil dan Pembahasan

Hasil determinasi menunjukkan bahwa jenis tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tamarindus indica* L. Penapisan fitokimia menunjukkan simplisia mengandung golongan flavonoid, fenol, terpenoid, dan steroid/ triterpenoid. Hal ini sejalan dengan penelitian sebelumnya (Mun'im et al. 2009) yang menunjukkan bahwa daun asam Jawa mengandung golongan terpenoid, fenol dan flavonoid.

Pemeriksaan makroskopik menunjukkan bahwa daun asam Jawa memiliki ibu tangkai daun dengan 20 pasang anak daun. Anak daun kecil berbentuk bundar telur yang agak tumpul di bagian pangkal. Karakterisasi simplisia menunjukkan kadar sari larut air 30,2 %, kadar sari larut etanol 24,8 %.

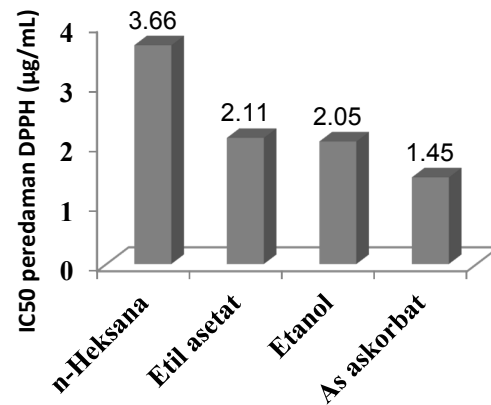
Bobot jenis ekstrak 1 % untuk masing-masing ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut adalah 0,67 gram/mL, 0,89 gram/mL dan 0,81 gram/mL.

Dari hasil pemantauan ekstrak, dapat dilihat bahwa kromatogram masing-masing ekstrak yang disemprot dengan DPPH 0,2% memberikan warna kuning dengan latar belakang ungu sehingga dapat disimpulkan bahwa ketiga ekstrak, yaitu ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol mengandung senyawa antioksidan.

Uji kuantitatif aktivitas antioksidan ekstrak dilakukan dengan metode peredaman DPPH. Uji ini digunakan untuk menentukan ekstrak yang akan dilanjutkan ke proses fraksinasi. Hasil uji kuantitatif aktivitas peredaman DPPH masing-masing ekstrak menunjukkan bahwa aktivitas peredaman DPPH ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut  $59,71 \pm 0,99\%$ ,  $58,42 \pm 1,52\%$ ,  $66,74 \pm 3,62\%$ .

Selain dilakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak menggunakan DPPH (50  $\mu\text{g/mL}$ : 50  $\mu\text{g/mL}$ ), dilakukan pula penentuan  $IC_{50}$  DPPH yaitu konsentrasi ekstrak yang dapat meredam 50 %

aktivitas DPPH. Ekstrak dengan beberapa seri konsentrasi digunakan untuk membuat kurva kalibrasi antara aktivitas peredaman DPPH (%) terhadap konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/mL}$ ). Asam askorbat digunakan sebagai pembanding dan dilakukan prosedur yang sama seperti ekstrak untuk menentukan  $IC_{50}$  asam askorbat.



Gambar 1.  $IC_{50}$  peredaman DPPH ekstrak daun asam Jawa.

Dari hasil  $IC_{50}$  peredaman DPPH dapat dilihat bahwa  $IC_{50}$  terendah diberikan oleh ekstrak etanol 2,05  $\mu\text{g/mL}$  disusul oleh ekstrak etil asetat 2,11  $\mu\text{g/mL}$  kemudian n-heksana 3,66  $\mu\text{g/mL}$ . Asam askorbat yang digunakan sebagai pembanding menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 1,45  $\mu\text{g/mL}$ . Semakin rendah  $IC_{50}$  peredaman DPPH menunjukkan semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu sampel. Dari data di atas dapat dilihat bahwa ekstrak daun asam Jawa memiliki  $IC_{50}$  yang lebih tinggi dari asam askorbat. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan peredaman DPPH oleh ekstrak daun asam Jawa lebih rendah dari pada asam askorbat. Berdasarkan klasifikasi oleh Blois (1958) maka dapat disimpulkan bahwa semua ekstrak uji daun asam Jawa (n-heksana, etil asetat dan etanol) termasuk antioksidan sangat kuat (lebih kecil dari 50  $\mu\text{g/mL}$ ).

Sebagai data pendukung dalam pemilihan ekstrak dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif terhadap masing-masing ekstrak. Pada masing-masing ekstrak dilakukan penapisan fitokimia yaitu untuk menguji keberadaan golongan fenol, flavonoid, dan karotenoid yang merupakan golongan yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Hasil penapisan fitokimia masing-masing ekstrak, menunjukkan bahwa ketiga ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol mengandung

golongan flavonoid, fenol, terpenoid dan steroid/triterpenoid.

Pada penetapan fenol total dalam ekstrak daun asam Jawa, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi asam galat dan diperoleh persamaan regresi  $y = 0,0044x + 0,031$ , dengan  $R^2 = 0,993$ . Untuk mengetahui kadar fenol total, absorbansi masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan regresi di atas. Hasil penetapan fenol total menunjukkan bahwa kadar fenol total ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut  $4,02 \pm 1,09$ ,  $3,41 \pm 0,16$  dan  $6,17 \pm 0,43$  g GAE/100g .

Flavonoid total dalam ekstrak daun asam Jawa diawali dengan pembuatan kurva kalibrasi kuersetin dan diperoleh persamaan regresi  $y = 0,00761355x + 0,00491857$ , dengan  $R^2 = 0,998$ . Untuk mengetahui

kadar flavonoid total, absorbansi masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan regresi di atas. Hasil penetapan flavonoid total menunjukkan bahwa flavonoid total ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut  $5,40 \pm 0,36$ ,  $6,51 \pm 0,18$  dan  $3,22 \pm 0,04$  g QE/100 g.

Pada penetapan karotenoid total dalam ekstrak daun asam Jawa, dilakukan pembuatan kurva kalibrasi beta karoten diperoleh persamaan regresi  $y = 0,02764x - 0,00324857$ ,  $R^2 = 0,999$ . Untuk mengetahui kadar karotenoid total, absorbansi masing-masing ekstrak dihitung menggunakan persamaan regresi di atas. Hasil penetapan karotenoid total menunjukkan bahwa karotenoid total ekstrak n-heksana, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol berturut-turut  $3,98 \pm 0,03$ ,  $2,37 \pm 0,16$  dan  $0,35 \pm 0,02$  g BE/100 g .

**Tabel 1.** Data Aktivitas Peredaman DPPH, Penetapan Kadar Fenol, Flavonoid, dan Karotenoid Total pada Ekstrak *Tamarindus indica* L

Hasil	n-Heksana	Etil asetat	Etanol
Aktivitas peredaman DPPH (%)	$59,71 \pm 0,99$	$58,42 \pm 1,52$	$66,74 \pm 3,62$
TPC (g GAE/100 g)	$4,02 \pm 1,09$	$3,41 \pm 0,16$	$6,17 \pm 0,43$
TFC (g QE/100 g)	$5,40 \pm 0,36$	$6,51 \pm 0,18$	$3,22 \pm 0,04$
TCC (g BE/100 g)	$3,98 \pm 0,03$	$2,37 \pm 0,16$	$0,35 \pm 0,02$

Dari hasil uji aktivitas antioksidan, dapat diketahui bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi dengan nilai aktivitas peredaman DPPH sebanyak 66,74% disusul oleh ekstrak n-heksana, kemudian ekstrak etil asetat.

Pola pemisahan yang paling baik ditunjukkan oleh ekstrak n-heksana, oleh karena itu ekstrak n-heksana dipilih untuk dilanjutkan ke tahap fraksinasi.

Fraksinasi terhadap ekstrak n-heksana dilakukan secara kromatografi cair vakum dengan menggunakan 11 komposisi eluen gradien yaitu campuran n-heksana dan etil asetat. Dari fraksinasi ini, diperoleh 11 fraksi yang selanjutnya dipantau secara kromatografi lapis tipis dengan fase gerak n-heksana-etil asetat (10:1).

Dari pemantauan fraksi dengan penampak bercak DPPH 0,2% dalam metanol, diketahui bahwa fraksi ke-4 dan 5 memberikan bercak kuning dengan latar belakang ungu, yang menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Fraksi ke-4 dan 5 dipilih untuk dilanjutkan ke tahap selanjutnya. Hal ini berdasarkan kemiripan profil kromatogram kedua fraksi tersebut.

Selanjutnya gabungan kedua fraksi tersebut

disubfraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom klasik. Pada tahap subfraksinasi ini, digunakan eluen n-heksana dan diperoleh 35 subfraksinasi. Pemantauan subfraksi dilakukan secara kromatografi lapis tipis dengan menggunakan penampak dan DPPH 0,2% dalam metanol.

Dari hasil pemantauan subfraksi 31-34 secara KLT dapat dilihat bahwa dalam subfraksi 31 tidak mempunyai pola yang sama dengan subfraksi 32 – 34. Kromatogram hasil pemantauan subfraksi 31 menunjukkan bahwa subfraksi 31 masih mengandung lebih dari 1 bercak. Selanjutnya subfraksi 31 dipilih untuk pemurnian lebih lanjut secara KLT preparatif.

Dari hasil KLT dipilih pita yang ketika disemprot DPPH 0,2% dalam metanol menunjukkan warna kuning. Pita tersebut dikerok (disebut pita A), kemudian diekstraksi dengan n-heksana, disaring, lalu dilakukan uji kemurnian secara KLT.

Dari hasil uji kemurnian pita A secara KLT pengembangan tunggal dengan tiga fase gerak berbeda kepolaran, masing-masing diperoleh satu bercak (selanjutnya disebut isolat E).

Selanjutnya dilakukan penentuan golongan isolat E dengan menggunakan penampak bercak sitroborat (penampak bercak golongan flavonoid), besi (III) klorida (penampak bercak golongan fenol) dan anisaldehida (penampak bercak golongan terpenoid). Hasil pemantauan menunjukkan hasil positif dengan penampak bercak sitroborat dan besi (III) klorida. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa isolat E adalah senyawa golongan flavonoid, yang juga merupakan senyawa golongan fenol.

Spektrum ultraviolet-sinar tampak isolat E (dalam pelarut metanol) menunjukkan bahwa isolat E memberikan puncak pada panjang gelombang 273 nm dan 365 nm. Berdasarkan pola spektrum UV-sinar tampak dapat diduga bahwa isolat E merupakan senyawa golongan flavonoid. Markham (1988) menyatakan bahwa jika senyawa golongan flavonoid mempunyai pita I pada  $\lambda \geq 350$  nm, diduga senyawa aglikon flavonol. Isolat E mempunyai pita I pada  $\lambda$  365 nm, maka diduga isolat E merupakan senyawa aglikon flavonol.

Isolat E memberikan warna fluoresensi kuning di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm, hal ini menunjukkan bahwa isolat E adalah flavonoid yang mempunyai gugus -OH bebas pada C-3 (Mabry et al. 1970). Hasil uji menunjukkan isolat E positif dengan penampak bercak  $\text{FeCl}_3$  mengindikasikan bahwa isolat E adalah senyawa golongan fenol. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa isolat E merupakan senyawa flavonoid, yang mempunyai gugus -OH pada cincin A dan atau cincin B.

Selanjutnya dilakukan kromatografi kertas dua dimensi terhadap isolat E, dengan fase gerak I butanol-asam asetat-air (4:1:5) dan fase gerak II asam asetat 15 %. Hasil kromatogram menunjukkan bahwa bercak isolat E ada pada posisi kiri bawah, sehingga dapat diduga bahwa isolat E adalah senyawa aglikon flavonol (Markham 1988).

Isolat E juga dikarakterisasi dengan spektrofotometri inframerah. Hasil karakterisasi menunjukkan adanya gugus OH ( $3316 \text{ cm}^{-1}$ ), gugus  $\text{CH}_3$  ( $2954 \text{ cm}^{-1}$ ), gugus C=O ( $1716 \text{ cm}^{-1}$ ) dan gugus aromatik ( $1457 \text{ cm}^{-1}$ ), yang menunjukkan gugus fungsi yang lazim terdapat pada senyawa golongan flavonoid.

Berdasarkan data spektrum UV-sinar tampak, warna bercak di bawah sinar UV  $\lambda$  366 nm, kromatogram kertas dua dimensi dan spektrofotometri inframerah, maka diduga isolat E merupakan senyawa aglikon flavonol, yang mempunyai -OH bebas pada C-3 dan diduga mempunyai -OH bebas pada cincin A dan atau B.

## Kesimpulan

Senyawa antioksidan E yang diperoleh dari ekstrak n-heksana merupakan senyawa aglikon flavonol, yang mempunyai -OH bebas pada C-3 dan diduga mempunyai -OH bebas pada cincin A dan atau B.

## Daftar pustaka

Blois MS, 1958, Antioxidant Determination by The Use of Stable Free Radicals, Nature 181: 1199-2000.

Chang C, Yang M, Wen H, Chern J, 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, J. Food Drug Anal. 10(3): 178-182.

Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB, 1970, The Systematic Identification of Flavonoids. Springer Verlag, Berlin.

Markham KR, 1988, Cara Mengidentifikasi Flavonoid, penerbit ITB, Bandung, hlm. 22, 39.

Molyneux P, 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, J. Sci. Technol. 26(2): 100-109.

Mun'im A, Hanani E, Rahmadiyah, 2009, Karakterisasi Ekstrak Etanolik Daun Asam Jawa (*Tamarindus Indica* L.), Majalah Ilmu Kefarmasian 6(1): 41-44.

Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N, 2006, Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Selected Iranian Medicinal Plants, Am. J. Bot. 5: 1143-1144

Selvi AT, Shipra S, Kritigha G, Chandrasekaran B, Rose C, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Leaves Extract (*Tamarindus indica* L.) and It's Phytochemical Characterisation, J. Pharm. Res. 4(12): 4435-4438.

Soemardji AA, 2007, *Tamarindus Indica* L. or "Asam Jawa": The Sour but Sweet and Useful, University of Toyama, Japan, 13.

Thaipong K, Unaraj B, Crosby K, Luis CZ, David HB, 2006, Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for Estimating Antioxidant Activity from Guajava Fruit Extracts, J. Food Comp. Anal. 19: 670-671.

Winarsi H, 2011, Antioksidan Alami dan Radikal Bebas, Penerbit Kanisius, Yogyakarta 11-12.