

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI METANOL DAUN PEGAGAN
(*Centella asiatica* (L.) Urban)**

Ietje Wientarsih¹, Sulistyantie Hr. Sjarif², Irma Maulani Hamzah²

¹*Laboratorium Farmasi Departemen Klinik, Reproduksi dan Patologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB*

²*Program Studi Kimia Sekolah Tinggi MIPA Bogor*

ABSTRAK

Pegagan (*Centella asiatica* (L.)Urban) merupakan tanaman herba tahunan yang tumbuh menjalar dan berbunga sepanjang tahun. Pegagan dirujuk sebagai antiinflamasi, antioksidan, antitumor, antibakteri atau untuk meningkatkan daya ingat (susunan syaraf pusat), eksim, luka bakar dan hepatitis. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui antioksidan fraksi metanol dari ekstrak metanol daun pegagan. Melalui tahapan pemisahan, pemurnian dan menentukan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil). Pada penelitian ini daun pegagan dimaserasi menggunakan pelarut metanol kemudian dilakukan uji fitokimia dan identifikasi gula. Pemurnian dilakukan dengan metode kromatografi kolom dengan elusi gradien menggunakan tiga eluen yaitu berturut-turut toluen : etil asetat (1:1), etil asetat, dan metanol. Identifikasi dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) siliska gel dengan eluen etil asetat : metanol : air (8,1 : 1,25 : 0,65). Terhadap fraksi metanol dilakukan uji aktivitas antioksidan. Hasil uji fitokimia terhadap fraksi metanol diperoleh golongan senyawa terpenoid, flavonoid, dan alkaloid. Hasil KLT fraksi metanol menunjukkan nilai Rf pada 0,64. Aktivitas antioksidan fraksi metanol diperoleh nilai IC₅₀ sebesar 481,64 ppm.

Kata kunci: Daun pegagan, kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis, aktivitas antioksidan.

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara kaya akan hasil alam yang melimpah dan dapat diolah serta dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Informasi yang terkait dengan tanaman yang diperoleh secara empiris selayaknya harus lebih digali lagi sehingga pada akhirnya tidak menutup kemungkinan akan menjadi suatu komoditas yang besar dan menguntungkan. Informasi tersebut harus dibuktikan secara ilmiah untuk mengetahui zat yang terkandung di dalam tanaman obat tersebut.

Salah satu tanaman obat yang diteliti dalam tulisan ini yaitu Pegagan atau Antanan (*Centella asiatica* (L) Urban). Pegagan dipercaya oleh masyarakat untuk meningkatkan

kemampuan memori dan pembelajaran yang mungkin berhubungan dengan aktivitas antioksidan, antiinflamasi, neuroprotektif, prokolinerjik, dan antikolinerjik (Joshi dan Parle, 2006).

Antioksidan adalah suatu zat yang dapat menghambat reaksi oksidasi atau mencegah pembentukan radikal bebas pada oksidasi (Gerald, 1987). Radikal bebas adalah atom-atom molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan, atom atau molekul suatu radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron (Ratri *et al.*, 2010). Proses penuaan dan penyakit degeneratif seperti kanker, penyumbatan pembuluh darah

seperti hiperlipidemik, aterosklerosis, stroke, dan tekanan darah tinggi serta terganggunya sistem imun tubuh dapat disebabkan oleh stres oksidatif dimana jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan dalam tubuh tidak seimbang (Suka, 2011). Pada kondisi ini, aktivitas molekul radikal bebas atau *Reactive Oxygen Species* (ROS) dapat menimbulkan kerusakan seluler dan genetika (Rahayu *et al.*, 2010).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) fraksi metanol dari ekstrak metanoldaun pegagan melalui tahapan isolasi, identifikasi, dan pemurnian.

METODE PENELITIAN

Bahan tanaman: Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban).

Bahan Kimia: metanol p.a, etanol 95%, n-heksan, asam asetat anhidrat, asam sulfat pekat, asam klorida pekat, pita magnesium, lakmus merah, kloroform, asam sulfat 2 N, pereaksi Dragendorf, Wagner, Benedict, Molisch dan Barfoed, amonia, natrium sulfat anhidrat, kalium hidroksida 5 N, hidrogen peroksida 3%, asam asetat glasial, benzena, asam klorida 2 N, natrium hidroksida 2 N, besi (III) klorida, kalium heksa siano ferrat (II), iodium 1%, eter, etil asetat, silika gel G₆₀.

Alat: blender, maserator, rotary evaporator, botol sampel, kolom dan bejana kromatografi, pelat TLC, lampu UV, penangas air, hotplate serta berbagai alat gelas yang biasa digunakan di Laboratorium.

Metode:

1. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Daun pegagan kering diiris, dihaluskan, diayak dengan ayakan 100 mesh, kemudian dimasukkan ke dalam maserator, ditambahkan metanol p.a sampai terendam. Sampel dibiarkan

sampai 24 jam sambil sesekali diaduk. Sampel disaring, maserat dimasukkan ke dalam wadah penampung, sedangkan ampas dimasukkan kembali ke dalam maserator untuk dimaserasi ulang. Maserasi dilakukan 3 kali ulangan, dan maserat dari tiap ulangan disatukan. Maserat kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator suhu 40°C (Tohir, 2010). Ekstrak kental ditimbang.

2. Penapisan Fitokimia

a. Terpenoid dan Steroid

Ekstrak kental dilarutkan dengan 10 mL n-heksan dan disaring. Filtrat dikisatkan di pelat tetes, kemudian ditambahkan 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna merah atau biru menunjukkan adanya terpenoid atau steroid (Juliati, 2008).

b. Flavonoid

Ekstrak kental dilarutkan dengan 15 mL n-heksan dan disaring. Filtrat ditambah 30 ml etanol dan dikocok. Sebanyak 2 ml lapisan etanol diambil kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 0,5 ml asam klorida pekat dan logam magnesium. Sampel dibiarkan beberapa saat sampai logam magnesium habis. Terbentuknya warna merah, jingga atau hijau pada larutan menunjukkan adanya flavonoid (Juliati, 2008).

c. Alkaloid

Ekstrak kental dilarutkan dengan 20 mL etanol lalu ditambahkan amonia tetes demi tetes sampai tidak terbentuk lagi endapan putih pada saat penambahan ammonia. Sampel disaring, residu dilarutkan dengan 10 ml etanol. Sebanyak 2 ml lapisan etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan ditambahkan pereaksi Wagner dan Dragendorf. Terbentuknya endapan berwarna merah kecoklatan oleh penambahan masing-masing pereaksi menunjukkan adanya alkaloid (Juliati, 2008).

d. Antrakuinon

Ekstrak kental ditambahkan 10 mL kalium hidroksida 5 N dan 1 mL hidrogen peroksida 3%. Setelah dikocok, dipanaskan di penangas air selama 10 menit, disaring kemudian filtrat diasamkan dengan asam asetat glasial. Kemudian ke dalamnya ditambahkan 10 mL benzena, dan dikocok. Sebanyak 5 mL lapisan benzena diambil, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 mL amonia lalu dikocok. Terbentuknya warna merah pada lapisan ammonia menunjukkan adanya antrakuinon (Juliati, 2008).

e. Senyawa Fenol

Ekstrak kental dilarutkan dalam 20 ml etanol, disaring, kemudian 2 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat menunjukkan adanya senyawa fenol (Yusro, 2010).

f. Tanin

Ekstrak kental dilarutkan dalam 20 ml etanol. Sampel disaring, kemudian sebanyak 2 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu ditambahkan 2 ml air dan besi (III) klorida, kemudian dikocok. Adanya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman pada larutan menunjukkan adanya tanin (Yusro, 2010).

g. Saponin

Ekstrak dilarutkan dalam 10 ml etanol, disaring, filtrat diuapkan dan ditambahkan air sebanyak 5 ml, dikocok kuat dan didiamkan selama 15 menit. Terbentuknya buih yang stabil selama tidak kurang dari 15 menit menunjukkan adanya saponin (Harborne, 1987).

3. Identifikasi Gula

a. Uji Molisch dan Iodium, Benedict dan Barfoed

Ekstrak dilarutkan dalam 10 ml etanol, ditambahkan 10 ml asam klorida 2 N, diaduk, dan dibiarkan selama 1 jam pada kondisi tertutup. Kemudian

ditambahkan 10 ml natrium hidroksida 2 N, diaduk, dan disaring. Sebanyak 1 ml filtrat ditambahkan 3 tetes pereaksi Molisch dan dikocok. Tabung reaksi dimiringkan kemudian kedalamnya dialirkan 1 ml asam sulfat pekat melalui dinding tabung secara perlahan. Terbentuknya cincin warna ungu pada batas kedua lapisan menunjukkan adanya karbohidrat (Ali, 2010). Untuk uji Iodium, 3 tetes filtrat dikisatkan di pelat tetes, kemudian ditambahkan 2 tetes Iodium. Terbentuknya warna coklat cerah menunjukkan adanya polisakarida (Ali, 2010). Uji Benedict, sebanyak 1 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml pereaksi Benedict, kemudian dipanaskan di penangas air selama 2 menit. Adanya endapan merah bata di bagian dasar tabung menunjukkan adanya gula pereduksi (Ali, 2010). Uji Barfoed, sebanyak 1 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 1 ml pereaksi Barfoed, dan dipanaskan di penangas air selama 5 menit. Terbentuknya endapan merah bata pada bagian dasar tabung menunjukkan adanya monosakarida (Ali, 2010).

4. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fasa gerak untuk elusi sampel adalah campuran toluena : etil asetat (9,3 : 0,7), heksana : metanol : aseton (9 : 0,5 : 0,5), toluen : etil asetat (1:1), kloroform : benzena (4:1) dan etil asetat : metanol : air (8,1 : 1,25 : 0,65). Untuk mengidentifikasi terpenoid, steroid, alkaloid, flavonoid dan fenolik. Sampel dilarutkan dengan alkohol. Noda yang ada diamati dengan pengamatan langsung dan dengan bantuan sinar UV. Noda disemprot dengan asam sulfat pekat. Komponen yang paling besar ditentukan dan dilanjutkan ke tahap pemurnian dengan kromatografi kolom.

5. Kromatografi Kolom

Sebanyak 100 gram silika gel G60 dilarutkan dengan fasa gerak kemudian dimasukkan ke dalam kolom dengan bantuan batang pengaduk sampai kolom terisi padat dan rata dengan silika. Sampel dilarutkan dengan alkohol kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi dengan fasa gerak. Fraksi yang didapatkan ditampung sebanyak 50 fraksi masing-masing 10 ml pada botol vial kemudian ditutup. Setiap fraksi diuji dengan KLT. Fraksi yang mengandung komponen yang sama digabungkan menjadi satu wadah. Fraksi yang paling banyak kandungan metabolitnya kemudian dipekatkan atau dikristalkan (Harborne, 1987). Sampel murni kemudian digunakan untuk uji antioksidan.

6. Uji Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH)

Larutan yang digunakan yaitu DPPH (1,1-difenil-2-pikril-hidrazil) $1,0 \times 10^{-3} \text{M}$ dalam metanol. Dipipet 1 mL larutan DPPH lalu dimasukkan ke dalam botol vial. Konsentrasi sampel yang digunakan dalam uji ini yaitu 50 (ppm); 100 ppm; 200 ppm; dan 400 ppm. Masing-masing konsentrasi tersebut dimasukkan ke dalam botol vial yang telah berisi larutan DPPH dan diencerkan dengan metanol sampai volume menjadi 5 mL. Diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm selama 30 menit (Juniarti dan Yuhernita, 2009). Aktivitas antioksidan diketahui dengan adanya penurunan serapan larutan DPPH. Nilai serapan larutan DPPH terhadap sampel disebut sebagai persen inhibisi (% inhibisi) dengan persamaan sebagai berikut :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{A}_{\text{kontrol}} - \text{A}_{\text{sampel}})}{\text{A}_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Keterangan :

A_{kontrol} = Absorbansi awal 0 menit

A_{sampel} = Absorbansi awal pada saat t menit

Nilai hasil perhitungan dimasukkan ke persamaan linier ($y = ax + b$) dengan konsentrasi ppm (mg/L) sebagai absis (sumbu x) dan nilai % inhibisi sebagai ordinatnya (sumbu y). Nilai *Inhibition Concentration 50%* (IC₅₀) diperoleh dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% (Suka, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tanaman pegagan diperoleh dari BALITTRO. Daunnya dikeringkan di bawah sinar matahari kemudian dikeringkan dan dihaluskan.

1. Ekstraksi

Sebanyak 1 kg simplisia kering daun pegagan dimaserasi dengan metanol sebanyak 4L, selanjutnya pada tahap kedua dan ketiga digunakan masing-masing 3L. Ekstrak metanol yang dihasilkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental (Harborne, 1987). Suhu waktu proses evaporasi yaitu 40°C. Bobot ekstrak daun pegagan yang diperoleh yaitu sebanyak 146,27 gram (rendemen ekstrak 14,63%).

2. Penapisan Fitokimia

Hasil penapisan fitokimia ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Penapisan Fitokimia Daun Pegagan

Parameter Uji	Hasil
Terpenoid	-
Steroid	+
Flavonoid	+
Saponin	-
Alkaloid (<i>Dragendorf</i>)	+
Alkaloid (<i>Wagner</i>)	+
Antrakuinon	-
Fenol	+
Tanin	+

Keterangan :

- + : Menunjukkan reaksi positif terhadap adanya endapan atau perubahan warna
- : Menunjukkan reaksi negatif terhadap adanya endapan atau perubahan warna

3. Hasil Identifikasi Gula

Identifikasi gula dengan uji Barfoed, Benedict, Iodium dan Molisch, hasilnya seperti pada Tabel 2 dibawah ini.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Gula

Uji Gula (Karbohidrat)	Hasil (+/-)
Uji <i>Barfoed</i>	-
Uji <i>Benedict</i>	+
Uji Iodium	+
Uji <i>Molisch</i>	+

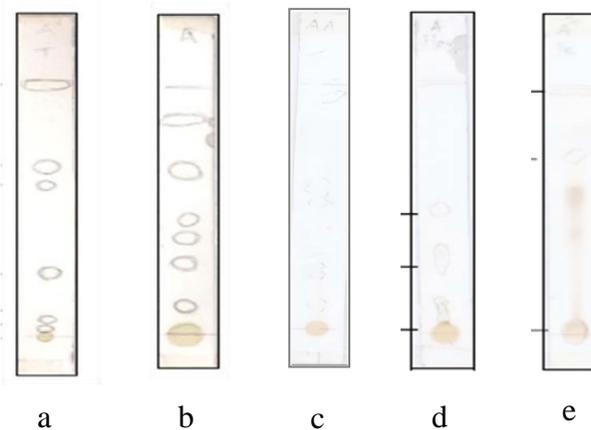
Keterangan :

- + : Menunjukkan reaksi positif terhadap adanya endapan atau perubahan warna
 - : Menunjukkan reaksi negatif terhadap adanya endapan atau perubahan warna
- Prinsip dari uji *Barfoed* yaitu Ion Cu^{2+} dari pereaksi *Barfoed* dalam suasana

4. Hasil Kromatografi Lapis Tipis

Untuk mengetahui adanya senyawa terpenoid, steroid, alkaloid, flavonoid dan senyawa fenol dalam ekstrak dibuat fase gerak dengan komposisi toluen : etil asetat (9,3 : 0,7), heksana : metanol :

aseton (9 : 0,5 : 0,5), toluen : etil asetat (1:1), kloroform : benzena (4:1) dan etil asetat : metanol : air (8,1 : 1,25 : 0,65). Setelah dielusi didapatkan noda-noda seperti pada Gambar 1 dibawah ini.



Gambar 1. Hasil KLT Terpenoid (a), steroid (b), alkaloid (c), Flavonoid (d) dan senyawa Fenolik (e) ekstrak metanol daun pegagan

5. Hasil Kromatografi Kolom

Fraksi metanol yang ditampung dilakukan penapisan fitokimia dilanjutkan KLT. Hasilnya pada Tabel 3 dan Gambar 2 dibawah ini.

Tabel 3 Hasil penapisan fitokimia fraksi metanol

Parameter Uji	Hasil (+/-)
Terpen	+
Steroid	-
Alkaloid	+
Flavonoid	+

Keterangan :

+ : Menunjukkan reaksi positif terhadap adanya endapan atau perubahan warna

- : Menunjukkan reaksi negatif terhadap adanya endapan atau perubahan warna



Gambar 2. Hasil KLT fraksi metanol daun pegagan

6. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran antioksidan dilakukan dengan inkubasi DPPH dengan ekstrak antioksidan selama 30 menit. Perubahan warna yang terjadi adalah dari larutan berwarna ungu menjadi larutan yang berwarna kuning. Pengukuran dilakukan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 516 nm. Fraksi metanol daun pegagan dibuat dengan deret konsentrasi yaitu 0 ppm; 50 ppm; 100 ppm; 200 ppm; dan 400 ppm. Sebagai kontrol digunakan larutan DPPH tanpa penambahan sampel. Hasil analisis secara kualitatif terhadap fraksi metanol adanya penurunan warna larutan DPPH yang menjadi pudar dan ketika diukur terjadi penurunan nilai absorbansi pada sampel. Hal ini menunjukkan adanya penangkapan radikal DPPH oleh senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi metanol daun pegagan.

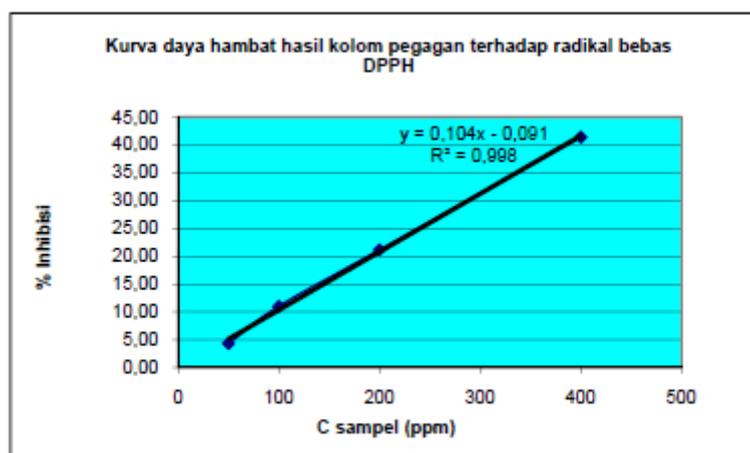
Tabel 3. Hasil Pengujian % Inhibisi fraksi metanol

Absorbansi kontrol (DPPH)	Absorbansi sampel pegagan + DPPH	Konsentrasi sampel pegagan (ppm)	% Inhibisi
0.899	0.860	50	4.34
0.899	0.800	100	11.01
0.899	0.709	200	21.13
0.899	0.527	400	41.38

Nilai IC_{50} fraksi metanol yang diperoleh sebesar 481,64 ppm. Menurut Listiani (2008) aktivitas antioksidan sebesar 100-500 ppm tergolong aktivitas antioksidan sedang. Semakin kecil nilai IC_{50} dari suatu antioksidan maka semakin kuat antioksidan tersebut. Untuk hasil aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Tabel 4 dan grafik ubungan antara % inhibisi dengan variasi konsentrasi fraksi metanol daun Pegagan pada Gambar 3.

Tabel 4. Hasil Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol

Sampel Uji	Konsentrasi (ppm) X	Inhibisi (%) Y	IC ₅₀ (ppm)
Kontrol	0	0.00	Persamaan : $r = 0.998$ $Y = 0.104x - 0.091$ $X = \frac{(50+0.091)}{0.104}$ $X = 481.64$
Pegagan	50	4.34	
	100	11.01	
	200	21.13	
	400	41.38	



Gambar 3. Grafik Hubungan Antara % Inhibisi dengan Variasi Konsentrasi fraksi metanol daun Pegagan

KESIMPULAN DAN SARAN

Melalui uji fitokimia, tanaman pegagan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder yaitu steroid, alkaloid, flavonoid, tanin, dan fenol dan dari uji gula, tanaman pegagan mengandung gula pereduksi, polisakarida, dan karbohidrat. Secara keseluruhan analisis kromatografi lapis tipis menghasilkan 26 jumlah noda golongan metabolit sekunder. Hubungan antara % inhibisi dengan variasi konsentrasi fraksi metanol daun pegagan mempunyai kandungan senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antioksidan dan melalui uji DPPH, pegagan mempunyai antioksidan pada tingkat sedang dengan nilai IC₅₀

sebesar 481,64 ppm. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk pengembangan metode kromatografi kolom terutama komposisi fase gerak agar senyawa yang dihasilkan lebih murni untuk dapat dilakukan uji UV/IR dan NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Ali, T., 2010. Uji Karbohidrat. <http://www.scribd.com/doc/46251470/uji-karbohidrat>. Diakses pada 18 Mei 2012.
- Gerald, S., 1987. Antioxidants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 61, 165-170.
- Harborne, J. B., 1987. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern

- Menganalisis Tumbuhan Edisi Kedua. ITB. Bandung.
- Joshi, H. and M. Parle. 2006. Brahmi Rasayana Improves Learning and Memory in mice. *eCAM*. 3(1):79-85.
- Juliati. 2008. Skrining Fitokimia Tumbuhan yang Digunakan oleh Pedagang Jamu Gendong untuk Merawat Kulit Wajah di Kecamatan Medan Baru. *Jurnal Biologi Sumatera*. Vol. 3, No. 1 Januari 2008. Departemen Kimia FMIPA-USU. ISSN 1907-5537.
- Juniarti, D. O., dan Yuhernita. 2009. *Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) dan Antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dari Ekstrak Daun Saga (Abrus precatorius L.)*. MAKARA, SAINS, Vol. 13, No. 1. APRIL 2009: Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta. 50-54
- Listianti, E., 2008. *Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kasar Daun Salam (Eugenia polyantha)*. Skripsi. Program Studi Kimia Jurusan Kimia Sekolah Tinggi MIPA Bogor.
- Rahayu, D. S., Kusri D., dan Fachriya E., 2010. *Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L) dengan Metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)*. Urial Laboratorium Kimia Organik. Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro.
- Ratri, K. G. R., 2010. *Tomat (Lycopersicon esculentum) Sebagai Antioksidan*. Kementerian Pendidikan Nasional Universitas Jenderal Soedirman Fakultas Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian. Purwokerto.
- Suka, I. S. R., 2011. *Uji Aktivitas Antioksidan Bawang Dayak (Eleutherine palmifolia (L.) Merr) dan Bawang Merah (Allium cepa L.)*. Skripsi. Program Studi Kimia Jurusan Sekolah Tinggi MIPA Bogor.
- Tohir, A. M., 2010. *Teknik Ekstraksi dan Aplikasi Beberapa Pestisida Nabati untuk Menurunkan Palatabilitas Ulat Grayak (Spodoptera litura Fabr.) di Laboratorium*. Teknisi Litkayasa Pelaksana Lanjutan pada Lab Resiu Bahan Agrokimia. Balai Penelitian Lingkungan Pertanian. Buletin Teknik Pertanian Vol. 15, No. 1, 2010 : 37-40.
- Yusro, F., 2010. *Rendemen Ekstrak Etanol dan Uji Fitokimia Tiga Jenis Tumbuhan Obat Kalbar*. Skripsi. Fakultas Kehutanan Universitas Tanjungpura.