

Pengujian antiradikal bebas difenilpikril hidrazil (DPPH) ekstrak etil asetat daun nangka (*Artocarpus heterophyllus Lamk*)

[Test for diphenilpikril hydrazyl (DPPH) free antiradikal from acetate etil extract of nangka leaf (*Artocarpus heterophyllus Lamk*)]

Hasmalina Nasution¹⁾ dan Musyirna Rahmah Nst²⁾

¹⁾ Universitas Muhammadiyah, Pekanbaru, Riau, Indonesia

²⁾ Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru, Riau, Indonesia
Telp. +6281371095606 dan Email: musyimarahmah@yahoo.com

diterima 25 Oktober 2014, disetujui 17 November 2014

Abstrak

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi resiko terhadap penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Karakter utama senyawa antioksidan adalah kemampuannya untuk menangkap radikal bebas. Senyawa antioksidan dari tumbuhan seperti vitamin C, vitamin E, karoten, asam-asam fenol, polifenol, dan flavonoid diketahui berpotensi mengurangi resiko penyakit degeneratif. Salah satu tanaman obat yang memiliki banyak khasiat adalah tanaman nangka (*Artocarpus Heterophyllus lamk*). Tanaman nangka telah diketahui secara empiris khasiatnya baik pada bagian daun, buah, biji buah, getah, dan kayu. Daun nangka dapat digunakan sebagai pelancar ASI, borok, dan luka. Selain itu, bioaktifnya berkhasiat sebagai antikanker, antivirus, dan antiinflamasi. Oleh karena faktor lingkungan seperti iklim, cuaca, dan lokasi tumbuh sangat berpengaruh terhadap komponen aktif suatu tumbuhan, maka pada penelitian ini telah dilakukan pengujian aktivitas antiradikal bebas DPPH terhadap daun nangka (*Artocarpus Heterophyllus lamk*) yang ada di Pekanbaru. Aktivitas Antioksidan ekstrak etil asetat daun nangka yang mengandung saponin dan steroid memiliki nilai IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) sebesar 778,76 ppm terhadap radikal DPPH.

Kata kunci: daun nangka, ekstrak, etil asetat, antioksidan, DPPH

Pendahuluan

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul disekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini, serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu antioksidan yang mampu menangkap radikal bebas tersebut sehingga tidak dapat menginduksi suatu penyakit [1-3].

Di dalam tubuh kita terdapat senyawa yang disebut antioksidan yaitu senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas, seperti: enzim SOD (Superoksida Dismutase), glutathione, dan katalase. Antioksidan juga dapat diperoleh dari asupan makanan yang banyak mengandung vitamin C, vitamin E dan betakaroten serta senyawa fenolik. Bahan pangan yang dapat menjadi sumber antioksidan alami, seperti rempah-rempah, coklat, biji-bijian, buah-buahan, sayur-sayuran dan sebagainya [4-6].

Indonesia merupakan negara kaya tanaman obat. Berbagai jenis tanaman obat tumbuh dengan baik. Tanaman obat tersebut sudah dipakai oleh masyarakat Indonesia, terutama dipedesaan selama beratus-ratus tahun. Sekalipun baru bersifat empiris, tanaman obat tersebut masih dipakai sampai sekarang

karena alasan efektifitas biaya dan tingkat keamanan. Salah satu tanaman obat yang memiliki banyak khasiat adalah tanaman nangka (*Artocarpus Heterophyllus* Lamk).

Tanaman pohon nangka telah diketahui banyak khasiatnya. Daun pohon nangka dapat digunakan sebagai pelancar ASI, borok, dan luka. Daging buah nangka muda dimanfaatkan sebagai makanan sayuran yang mengandung albuminoid dan karbohidrat. Sementara biji nangka dapat digunakan sebagai obat batuk dan tonik [7]. Biji nangka dapat diolah menjadi tepung yang digunakan sebagai bahan baku industri makanan. Khasiat kayu sebagai *anti spasmodic* dan *sedative*, daging buah sebagai ekspektoran. Getah kulit kayu digunakan sebagai obat demam, obat cacing dan antiinflamasi. Kandungan kimia dalam kayu adalah morin, sianomaklurin (zat samak), flavon, dan tanin. Selain itu, di kulit kayunya juga terdapat senyawa flavonoid yang baru, yakni morusin, artonin E, sikloartobilosanton, dan artonol B. Bioaktivitasnya terbukti secara empirik sebagai antikanker, antivirus, antiinflamasi, diuretik, dan antihipertensi [8].

Oleh karena faktor lingkungan seperti iklim, cuaca, dan lokasi tumbuh sangat berpengaruh terhadap komponen aktif suatu tumbuhan, maka perlu dilakukan pengujian aktivitas antiradikal bebas DPPH terhadap daun nangka yang ada di Pekanbaru. Dalam penelitian ini akan dilakukan pengujian antiradikal bebas DPPH terhadap ekstrak etil asetat daun nangka sebagai skrining zat aktif. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tambahan tentang daun nangka sebagai antioksidan alami.

Metodologi

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu wadah/botol berwarna gelap, pisau/gunting, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10 UV), *vacum rotary evaporator* (Buchi 461 Water Bath), vial, tabung reaksi, pipet tetes, pipet takar, *becker glass*, corong, labu ukur, dan aluminium foil.

Bahan-bahan yang digunakan: daun nangka segar, etanol, etil asetat, n-heksan, aquades, metanol, DPPH (*2,2-diphenil-1-picrilhidrazil*), dan vitamin C.

Pengambilan dan Identifikasi Sampel

Tumbuhan Nangka (*Artocarpus Heterophyllus* Lamk) diambil di daerah Kulim Pekanbaru Riau.

Ekstraksi Sampel

a) Perajangan

Daun yang telah diambil dicuci dengan air mengalir kemudian dikering anginkan. Setelah itu daun dirajang, dan ditimbang berat kering daunnya.

b) Perendaman

Sampel yang telah dirajang kemudian dimasukkan kedalam botol berwarna gelap dan dimaserasi dengan pelarut nonpolar yaitu heksan, perendaman dilakukan sebanyak tiga kali selama ± 5 hari dengan sesekali diaduk. Hasil maserasi kemudian disaring dengan kertas saring dan filtratnya dipindahkan kedalam bejana tertutup. Dan hasil maserasi di evaporasi sehingga didapatkan pelarut dan ekstrak yang terpisah (ekstrak heksan). Residunya dimaserasi selama ± 5 hari dengan pelarut bersifat semi polar yaitu etil asetat hingga didapatkan filtrat dan residunya. Filtrat yang dihasilkan di evaporasi sehingga didapatkan ekstrak etil asetat,

c) Pemekatan

Ekstrak yang diperoleh dikentalkan dengan alat *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental heksan, ekstrak kental etil asetat, daun nangka.

Uji Fitokimia

Uji Kandungan Kimia Golongan Alkaloid

Ekstrak daun nangka masukkan dalam tabung reaksi tambahkan 10 ml kloroform amoniak 0,05 N, dikocok lalu tambahkan 10 tetes asam sulfat 2 N dan kocok perlahan. Biarkan sejenak hingga terbentuk pemisahan lapisan asam dan lapisan kloroform. Ambil lapisan asam kedalam tabung reaksi lalu tambahkan satu tetes pereaksi mayer. Reaksi positif ditandai dengan adanya kabut putih hingga gumpalan putih atau endapan.

Uji Kandungan Kimia Golongan Flavonoid, Fenolik, Saponin, Steroid dan Terpenoid

Ekstrak daun nangka dimasukkan dalam tabung reaksi lalu tambahkan pelarut kloroform dan air suling sebanyak 5 ml (1:1), kocok perlahan dan biarkan sampai terbentuk pemisahan sempurna antara kloroform dan air. Masing-masing pelarut yang memisah dipindahkan dalam tabung reaksi. Lapisan kloroform dibagian bawah digunakan untuk pemeriksaan senyawa terpenoid dan steroid, sedangkan lapisan air untuk pemeriksaan kandungan kandungan flavonoid, fenolik dan saponin.



Gambar 1. Tumbuhan Nangka (*Artocarpus heterophyllus* Lamk)

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Masing-masing sampel ditimbang sebanyak 5 mg kemudian dilarutkan dalam 5 mL metanol dalam labu ukur 5 mL sehingga didapat konsentrasi larutan sampel 0,1%. Penentuan aktivitas antioksidan dipipet 0,2 mL larutan sampel menggunakan pipet takar dan dimasukkan ke dalam vial. Kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 50 µM. Campuran larutan dihomogenkan, dan dibiarkan selama 30 menit pada tempat gelap. Serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515 nm [9]. Sebagai kontrol positif adalah Vitamin C.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus [10].

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. Kontrol}} \times 100 \%, \quad (1)$$

dengan Abs. kontrol adalah serapan radikal DPPH 50 µM pada panjang gelombang 515 nm, dan Abs. sampel adalah serapan sampel dalam radikal DPPH 50 µM pada panjang gelombang 515 nm.

Hasil dan Pembahasan

Hasil identifikasi sampel yang dilakukan di laboratorium Biologi Universitas Riau menunjukkan bahwa sampel merupakan tumbuhan asam jawa (*Tamarindus indica* Linn) dengan famili Moraceae (Gambar 1).

Pemeriksaan pendahuluan metabolit sekunder atau uji fitokimia dari daun nangka memperlihatkan hasil positif terhadap saponin dan steroid dan negatif flavonoid, terpenoid dan fenolik . Saponin adalah suatu glikosida yang ada pada banyak macam tanaman. Saponin mempunyai rasa pahit, dalam larutan air membentuk busa yang stabil dan sulit untuk dimurnikan. Sedangkan steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasil reaksi penurunan dari terpena atau skuarena.

Tabel 1. Hasil pemeriksaan kandungan metabolit sekunder ekstrak Etil Asetat daun nangka.

No.	kandungan kimia	pereaksi	hasil
1	Saponin	Air/busa	+
2	Flavonoid	HCl	-
3	Terpenoid	Lieberman-Buchard	-
4	Steroid	Buchard	+
5	Fenolik	FeCl ₃	-
6	Alkaloid	Mayer	-

Keterangan : + = Bereaksi positif
 - = Bereaksi negatif

Pada pengujian ini digunakan sampel kering daun nangka. Sampel dirajang dan dihaluskan dengan blender sehingga didapat serbuk halus sejumlah 50 g. Sampel yang akan dimaserasi dirajang halus untuk untuk mengurangi kadar air pada sampel sehingga dapat mencegah tumbuhnya jamur serta mempermudah proses penguapan pelarut, memperbesar luas permukaannya sehingga lebih banyak kontak dengan pelarut. Botol yang digunakan dalam metoda maserasi ini adalah

botol berwarna gelap dan penyimpanan juga di tempat yang terlindung dari cahaya. Hal ini dimaksudkan untuk menghindari penguraian zat oleh cahaya (fotolisis). Ekstraksi dilakukan secara maserasi bertingkat selama 3 hari dengan 3 kali pengulangan (3 x 3 hari). Hal ini dimaksudkan agar proses penarikan zat-zat dari sampel sempurna. Ekstraksi ini dilakukan dengan pelarut secara berturut-turut dengan heksan, diklorometan, dan metanol. Kemudian maserat diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 30-40°C, hingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksana dan etil asetat.

Ekstrak kental etil asetat daun nangka dilakukan pemeriksaan aktivitas antioksidan dengan metoda DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metoda ini dipilih karena pengukurannya sederhana, mudah, cepat dan peka serta membutuhkan sedikit sampel [9]. DPPH adalah radikal bebas yang diperdagangkan, stabil pada suhu kamar dengan bentuk serbuk violet kehitaman, cepat teroksidasi oleh temperatur, cahaya dan udara, mudah larut dalam etanol, dengan BM 394,3 gr/mol [11]. Oleh karena itu, pengerjaan pemeriksaan aktivitas antioksidan harus dilakukan dalam ruangan gelap dan peralatan yang digunakan harus dilapisi dengan aluminium foil.

Larutan DPPH 50 µM dalam metanol berwarna ungu tua dengan profil spektra sinar tampak (360-720 nm) seperti terlihat pada Gambar 11. Adanya delokalisasi elektron di seluruh bagian molekul DPPH memberikan warna ungu tua (dalam metanol), yang ditandai dengan adanya pita absorpsi di sekitar panjang gelombang 515 nm [12].

Uji aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh ekstrak uji berdasarkan prinsip penurunan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan penurunan konsentrasi DPPH. Senyawa uji penangkap radikal akan memberikan hidrogen kepada DPPH membentuk DPPH-H tereduksi yang berwarna kuning. Senyawa antiradikal yang telah menyumbangkan H radikal berubah menjadi radikal baru yang stabil [13].

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi. Semakin besar persentase inhibisi sampel maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya [14]. Dari pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat diperoleh persen inhibisi pada konsentrasi 1000 ppm adalah 65,60 %. Hasil ini menunjukkan ekstrak

etil asetat memiliki potensi aktivitas antioksidan akan tetapi aktivitasnya lebih rendah dibandingkan dengan vitamin C 96,74%. Oleh karena sampel masih dalam bentuk ekstrak sehingga peneliti belum dapat menentukan senyawa apa yang berperan terhadap aktivitas tersebut karena pada ekstrak masih banyak terdapat senyawa-senyawa kimia. Untuk menjawab hal tersebut harus dilakukan pemurnian dengan jalan isolasi senyawa murni. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Menurut literatur, sampel yang mempunyai aktifitas antioksidan kuat memiliki IC₅₀ kurang dari 200 µg/ml [9].

Tabel 2. Nilai-nilai IC₅₀ ekstrak Etil Asetat daun nangka dan vitamin C.

sampel		persamaan regresi linear	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak Asetat	Etil	$Y = 0,062X + 1,717$ $R^2 = 0,989$	778,76
Vitamin C		$Y = 0,468X + 9,590$ $R^2 = 0,950$	86,35

Hasil analisis nilai IC₅₀ dari ekstrak metanol daun nangka adalah 778,76 ppm. Sedangkan vitamin C sebagai pembanding memiliki IC₅₀ sebesar 86,35 ppm. Berdasarkan hasil IC₅₀ tersebut diketahui ekstrak etil asetat daun nangka memiliki aktivitas antioksidan sembilan kali lebih kecil dibandingkan aktivitas antioksidan vitamin C yang telah terbukti terhadap penghambatan radikal bebas. Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat daun nangka ini termasuk kategori lemah.

Dari hasil uji fitokimia daun nangka, senyawa yang mengkontribusi aktivitas antioksidan berasal dari golongan saponin dan steroid. Aktivitas antioksidan terutama disumbangkan oleh senyawa golongan fenolik seperti flavonoid, asam-asam fenolat dan fenol diterpen [13]. Berbagai senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan diantaranya adalah karoten dan vitamin C serta senyawa polifenol epikatekin, katekin, galotekin, epigalokatekin, quersetin, quersitrin, isoquersitrin, mirisitrin dan asam galat. Senyawa karotenoid larut lemak, vitamin C larut air, vitamin E larut lemak. Tingkat efisiensi antioksidan dari flavonoid tergantung pada tingkat hidrosilasi. Aktivitas antioksidan flavonoid akan turun jika flavonoid tersubstitusi dengan gula.

Kesimpulan

1. Ekstrak Etil Asetat Daun Nangka mengandung senyawa saponin dan steroid.
2. Aktivitas antioksidan ekstrak etil asetat daun nangka (IC_{50} 778,76 ppm) terhadap radikal DPPH lebih kecil dibandingkan Vitamin C (IC_{50} = 86,35 ppm).

Saran

Agar dilakukan uji aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol daun nangka dan dilakukan isolasi senyawa kimia untuk mengetahui senyawa apa yang berkontribusi aktivitas tersebut.

Ucapan Terimakasih

Terimakasih diucapkan kepada Universitas Muhammadiyah Riau melalui LP2M yang telah membiayai penelitian ini dalam Skim Hibah Dosen Pemula dengan kontrak No.806/010/KM/2013.

Daftar Pustaka

- [1]. H. Kikuzaki, M. Hisamoto, K. Hirose, K. Akiyama, dan H. Taniguchi, *J. Agric. Food Chem*, 50 (2002) pp. 2161-2168.
- [2]. P. Sibuea, *Antioksidan Senyawa Ajaib Penangkal Penuaan Dini*, Sinar Harapan, Yogyakarta, 2003.
- [3]. B. Halliwell dan J. M. C. Gutteridge, *Free Radical in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York, 2000.
- [4]. A. Prakash, *Analithycal Progress*, 19 (2001) 2, pp 1 – 4.
- [5]. B. Frei, *Natural Antioxidant in Human Health and Disease*, Academic Press, San Diego, California, 1994.
- [6]. R. Trevor, *Kandungan Organik Tumbuhan*, ed.6, diterjemahkan oleh Kosasih, Padmawinata, ITB, Bandung, 1995.
- [7]. K. Heyne, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid II, Badan Litbang Kehutanan, Jakarta, 1987.
- [8]. T. Ersam, *Senyawa Kimia Makromolekul beberapa Tumbuhan Artocarpus Hutan tropika Sumatera Barat*, Disertasi ITB, Bandung, 2001.
- [9]. E., Hanani, A. Mun'im, dan R. Sekarini, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II (2005) 3.
- [10]. R. Andayani, Y. Lisawati, dan Maimunah, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, Vol 13 (2008) (1).
- [11]. G. A. Corrdel, A. D. Kinghom, dan J. M Pezzuto, *Sepration, Structure Elucidation and Bioassay of Citotoxic Natural Product*, CRC Press, Florida, 1993.
- [12]. P. Molyneux, *J.Sci. Technol.*, 26 (2004) (2), pp 211-219.
- [13]. S. Nurwaini, M. Da'i, dan N. Robithoh N, *Pharmacon*, 6 (2005) (2).
- [14]. M. Latief, S. Soetardjo, H. Bahti, dan Dachriyanus, *Pharmacy*, 05 (2007) (02).