

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI N-HEKSANA, KLOOROFORM DAN ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL *Limnocharis flava* DENGAN METODE DPPH

Iin Narwanti, Isa Amilia Hamida

Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan

iin.narw@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman genjer (*Limnocharis flava*) mengandung senyawa polifenol yang dapat berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil KLT dan kemampuan fraksi *n*-heksana, kloroform dan etil asetat ekstrak etanol *L. flava* dalam menangkap radikal bebas DPPH. Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol 70% untuk mendapatkan ekstrak etanol. Ekstrak etanol yang diperoleh selanjutnya difraksinasi secara bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksana, kloroform dan etil asetat. Uji penangkapan radikal bebas dilakukan dengan metode DPPH, dimana persen penangkapan radikal bebas dinyatakan sebagai ES₅₀. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan ES₅₀ ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, kloroform dan etil asetat berturut-turut adalah 0,209; 2,128; 1,117 dan 1,042 mg/mL, sedangkan kontrol positif (asam galat) mempunyai harga ES₅₀ sebesar 3,365 µg/mL. Fraksi *n*-heksana, kloroform dan etil asetat ekstrak etanol *L. flava* mempunyai potensi antioksidan yang lebih rendah dibanding asam galat.

Kata kunci: antioksidan, *L. flava*, asam galat, DPPH

ABSTRACT

Yellow velvetleaf (Limnocharis flava) contain polyphenol compounds that can act as antioxidants. The aim of this research is to investigate TLC profile and ability of n-hexane, chloroform and ethyl acetate fraction of L. flava ethanolic extract in scavenging DPPH free radical. Maceration was done with 70% ethanol solvent to obtain ethanol extract. The ethanolic extract obtained was subsequently fractionated using n-hexane, chloroform and ethyl acetate solvents. Free radical scavenging tests was performed by the DPPH method, where percent of free radical scavenging was expressed as ES₅₀. The antioxidant activity test showed ES₅₀ of ethanolic extract, n-hexane fraction, chloroform and ethyl acetate respectively were 0.209, 2.128, 1.117 and 1.042 mg/mL, while the positive control of gallic acid has an ES₅₀ value of 3.365 µg/mL. The fraction of n-hexane, chloroform and ethyl acetate L. flava ethanol extract has a lower potential as antioxidant than gallic acid.

Keywords: antioxidant, *L. flava*, gallic acid, DPPH

PENDAHULUAN

Negara Indonesia mempunyai keanekaragaman hayati yang dapat dieksplorasi dan dimanfaatkan untuk kepentingan bersama. Dengan adanya keanekaragaman hayati ini, maka sangat mungkin dilakukan penggalan potensi berbagai tanaman untuk dikembangkan sebagai obat atau bahan baku obat¹.

Salah satu tanaman yang mempunyai potensi sebagai antioksidan adalah tanaman genjer (*L. flava*). Di satu sisi, tanaman ini dianggap sebagai gulma, tetapi di sisi lain tanaman genjer ini mempunyai kandungan gizi. Kandungan gizi *L. flava* antara lain kalsium, besi dan β -karotene². Komponen bioaktif pada daun *L. flava* adalah flavonoid, fenol, hidrokuinon, gula pereduksi dan asam amino³. *L. flava* mengandung senyawa fenolik dan flavonoid, dimana kandungan total fenolik sebesar 5,4 mg GAE/g tanaman dan total flavonoid sebesar 3,7 mg RE/g tanaman⁴.

Radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh akibat gaya hidup, pola makan, asap rokok, alkohol, polusi

kendaraan bermotor dan paparan sinar ultraviolet, dapat bereaksi dengan makro molekul pembentuk sel yaitu protein, karbohidrat dan lemak. Reaksi ini terjadi secara berantai, cepat dan tak terkendali. Jika ketahanan tubuh tidak mampu menahan serangan dari radikal bebas maka dapat mengakibatkan kerusakan sel yang berperan dalam proses terjadinya penyakit degeneratif. Upaya pencegahan dapat dilakukan dengan mengkonsumsi asupan antioksidan misalnya sayur-sayuran, buah-buahan dan bahan-bahan alam yang mempunyai aktivitas antioksidan. Antioksidan dari golongan senyawa sintetik mulai ditinggalkan karena toksik juga karsinogenik, dan saat ini lebih dipilih antioksidan dari bahan alami.

Aktivitas antioksidan *L. flava* dilihat dari nilai IC₅₀. Hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ dari ekstrak kasar, pengukusan 3 menit dan pengukusan 5 menit daun *L. flava* berturut-turut adalah 131,03, 1350 ppm dan 3409 ppm⁵.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian yang lebih intensif untuk mengetahui aktivitas sebagai penangkap radikal bebas fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat ekstrak etanol *L. flava* sehingga potensi tanaman ini dapat lebih dikembangkan.

METODE PENELITIAN

Alat yang digunakan: alat-alat gelas, timbangan analitik, *Halogen Moisturizer Analyzer* dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV PharmaSpec 1700). Bahan yang digunakan: tanaman genjer (*L. flava*) yang diperoleh dari desa Balecatur Kecamatan Gamping Kabupaten Sleman Yogyakarta, etanol, asam galat, DPPH, *n*-heksana, kloroform, etil asetat.

Prosedur Penelitian

1. Penyiapan bahan utama

Tanaman genjer (*L. flava*) disortasi. Pengeringan dilakukan dengan cara dioven pada suhu 40-50°C, selanjutnya dibuat serbuk. Serbuk yang diperoleh kemudian diayak hingga diperoleh ukuran serbuk yang seragam. Serbuk dimaserasi dengan etanol dengan

perbandingan (1:5). Pengadukan dilakukan selama 3 jam, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat disaring dengan menggunakan corong Buchner. Remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Filtrat diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental, selanjutnya difraksinasi secara bertingkat dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat. Serbuk/simplisia dan ekstrak etanol ditetapkan kadar air dan abu.

2. Uji kualitatif aktivitas

penangkapan radikal bebas

Sebanyak 0,5 mL larutan sampel ditambah dengan 0,5 mL pereaksi DPPH 0,15 mM. Adanya aktivitas antioksidan ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari ungu menjadi kuning⁶.

3. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas secara kuantitatif dengan metode DPPH

a. Penentuan *Operating Time* (OT). Masing-masing 1,0 mL larutan sampel dan larutan kontrol positif (asam galat) ditambah dengan 1,0 mL larutan pereaksi DPPH 0,15 mM

dalam tabung reaksi kering, dikocok homogen, kemudian diamati absorbansinya selama 0-120 menit jam pada panjang gelombang 517 nm⁷.

b. Penentuan panjang gelombang maksimal.

Sebanyak 1,0 mL larutan pereaksi DPPH 0,15 mM ditambah dengan 1,0 mL etanol, dikocok homogen, kemudian diukur serapannya pada panjang gelombang 450-600 nm. Penentuan panjang gelombang pada serapan maksimum juga dilakukan untuk kontrol negatif⁷.

c. Pengukuran serapan larutan. Masing-masing 1,0 mL larutan sampel serta larutan asam galat ditambah dengan 1,0 mL larutan pereaksi DPPH 0,15 mM dalam tabung reaksi kering, dikocok homogen dan diinkubasi selama operating time, kemudian diamati serapannya pada panjang gelombang maksimal DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis. Untuk kontrol negatif digunakan etanol 1,0 mL ditambah 1,0 mL larutan pereaksi DPPH.

4. Analisis data

Data serapan dihitung persen

penangkapan radikal bebasnya dengan rumus⁸.

$$\% \text{ penangkapan radikal bebas} = \{(S_k - S_{sp}) / S_k\} \times 100\%$$

Dimana:

S_k = serapan kontrol

S_{sp} = serapan sampel.

Data persen penangkapan radikal bebas yang diperoleh dan konsentrasi senyawa uji, kemudian dibuat persamaan regresi linier untuk menentukan harga ES_{50} (*Effective Scavenging*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang mampu menangkap radikal bebas sebesar 50%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Simplisia yang telah mengalami proses pengeringan ditentukan kandungan airnya. Syarat mutu kadar air simplisia tidak melebihi 10%. Kadar air simplisia *L. flava* sebesar 4,13±0,061%. Kadar air simplisia tersebut telah memenuhi syarat mutu untuk kadar air simplisia yaitu tidak lebih dari 10%. Penetapan kadar abu simplisia dan ekstrak etanol *L. flava* juga dilakukan untuk memberikan gambaran kandungan mineral yang berasal dari proses awal

sampai terbentuk ekstrak. Nilai atau rentang yang diperbolehkan, terkait dengan kemurnian dan kontaminasi⁹. Kadar abu simplisia dan ekstrak etanol *L. flava* berturut-turut adalah $20,14 \pm 0,380\%$ dan $15,77 \pm 0,217\%$. Tingginya kadar abu dapat disebabkan tingginya kandungan mineral dan dalam tanah maupun air di tempat tanaman tersebut tumbuh⁸.

Pelarut etanol mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar dan non polar, sehingga senyawa aktif seperti polifenol yang berperan terhadap aktivitas antioksidan yang terkandung dalam *L. flava* dapat

tersari dalam pelarut etanol tersebut. Hal ini juga sesuai dengan yang dilaporkan sebelumnya, dimana metanol dan etanol merupakan pelarut yang sesuai untuk mengekstraksi senyawa polifenol¹⁰.

Fraksinasi ekstrak etanol dengan menggunakan pelarut berturut-turut yaitu *n*-heksana, kloroform dan etil asetat. Filtrat hasil fraksinasi diuapkan sampai diperoleh fraksi *n*-heksana, kloroform dan etil asetat kental. Hasil rendemen ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil rendemen ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat

Sampel	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol	49,1	8,18
Fraksi <i>n</i> -heksana,	2,315	7,716
Fraksi kloroform	15,955	53,183
Fraksi etil asetat	0,141	0,470

Pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak etanol dan fraksi fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat *L. flava* dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini dipilih karena pada uji kualitatif aktivitas penangkapan radikal bebas

dengan menggunakan pereaksi DPPH, sampel mampu menangkap radikal bebas DPPH yang ditandai dengan pengurangan warna ungu dari DPPH. Metode DPPH adalah salah satu metode yang paling umum digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan, khususnya untuk

senyawa fenol atau polifenol¹¹. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat *L. flava* yang tinggi. Penurunan intensitas warna ungu dapat dihitung secara kuantitatif dengan berkurangnya absorbansi larutan. Pada dasarnya absorbansi yang terukur merupakan absorbansi sisa DPPH dalam larutan yang tidak ditangkap oleh senyawa penangkap radikal bebas, dimana semakin besar konsentrasi uji maka absorbansi yang dihasilkan semakin

dibandingkan dengan asam galat yang merupakan senyawa yang telah diketahui mempunyai aktivitas antioksidan kecil. Penentuan waktu operasional dilakukan terhadap salah satu konsentrasi sampel dan larutan asam galat yang direaksikan dengan larutan DPPH. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ asam galat, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, kloroform dan etil asetat dapat dilihat pada Tabel 2, 3, 4, 5 dan 6.

Tabel 2. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ asam galat

Replikasi	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (%)					R	Pers. Regresi	ES ₅₀ (µg/mL)
	Konsentrasi (µg/mL)							
	1,00	2,00	3,00	4,00	5,00			
1	14,71	30,63	44,84	61,06	72,27	0,9969	Y=14,550 X+1,037	3,364
2	14,21	28,83	45,15	61,26	71,37	0,9944	Y=14,675 X+1,039	3,336
3	16,22	29,93	43,24	61,56	70,77	0,9929	Y=14,073 X+2,125	3,401
4	13,61	30,63	44,94	61,26	72,77	0,9963	Y=14,895 X -0,043	3,359
	Rerata							3,365

Tabel 3. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ ekstrak etanol *L. flava*

Replikasi	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (%)					R	Pers. Regresi	ES ₅₀ (mg/mL)
	Konsentrasi (mg/mL)							
	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50			
1	39,27	49,88	61,21	68,63	73,47	0,9760	Y=87,150X+32,347	0,203
2	34,27	50,00	63,44	69,81	77,83	0,9660	Y=106,930X+26,991	0,215
3	37,85	50,94	59,91	67,81	73,7	0,9779	Y=88,570X+31,471	0,209
4	35,61	51,89	62,93	68,99	75,43	0,9522	Y=96,740X+29,948	0,207
	Rerata							0,209

Tabel 4. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ fraksi *n*-heksana *L. flava*

Replikasi	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (%)					R	Pers. Regresi	ES ₅₀ (mg/mL)
	Konsentrasi (mg/mL)							
	1,00	1,50	2,00	2,50	3,00			
1	30,29	39,52	49,85	55,57	62,99	0,9897	Y=16,290X+15,064	2,145
2	29,49	40,72	49,95	56,77	64,79	0,9910	Y=17,330X+13,684	2,096
3	29,79	39,62	50,05	55,57	63,59	0,9887	Y=16,710X+14,304	2,136
4	29,09	40,02	40,45	56,27	63,49	0,9893	Y=17,010X+13,644	2,137
Rerata								2,128

Tabel 5. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ fraksi kloroform

Replikasi	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (%)					R	Pers. Regresi	ES ₅₀ (mg/mL)
	Konsentrasi (mg/mL)							
	0,50	0,80	1,10	1,40	1,70			
1	26,77	40,09	51,68	60,02	68,60	0,9886	Y=34,530X+11,449	1,116
2	26,19	40,56	52,72	60,83	68,13	0,9782	Y=34,717X+11,498	1,109
3	26,54	40,44	51,8	60,49	67,21	0,9802	Y=33,797X+12,120	1,121
4	26,19	39,63	52,38	60,02	67,79	0,9810	Y=34,530X+11,219	1,123
Rerata								1,117

Tabel 6. Persen penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai ES₅₀ fraksi etil asetat *L. flava*

Replikasi	Aktivitas Penangkapan Radikal DPPH (%)					R	Pers. Regresi	ES ₅₀ (mg/mL)
	Konsentrasi (mg/mL)							
	0,50	0,70	0,90	1,10	1,30			
1	31,51	37,76	45,54	51,79	58,64	0,9990	Y=34,145X+14,318	1,045
2	33,55	37,88	46,81	51,42	58,42	0,9900	Y=31,640X+17,140	1,039
3	32,65	39,29	45,54	51,79	58,29	0,9999	Y=31,890X+16,811	1,041
4	32,14	38,39	45,79	51,79	58,42	0,9992	Y=32,98X+15,624	1,042
Rerata								1,042

Aktivitas antioksidan sampel dilihat dari nilai ES₅₀ (*Effective Scavenging*) yaitu konsentrasi senyawa sampel yang dapat menangkap radikal bebas DPPH sebesar 50%. Harga ES₅₀ yang diperoleh untuk asam galat, ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat *L. flava* berturut-turut adalah 208,55; 2,128; 1,117 dan 1,042 mg/mL.

Pada hasil penelitian ini terlihat bahwa aktivitas asam galat sebagai penangkap radikal bebas jauh lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat tanaman genjer, sedangkan aktivitas ekstrak etanol sebagai penangkap radikal bebas lebih besar bila dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat *L. flava*.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol mempunyai potensi sebagai penangkap radikal bebas lebih besar bila dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat. Nilai ES_{50} ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat *L. flava* berturut-turut adalah berturut-turut adalah 208,55; 2,128; 1,117 dan 1,042 mg/mL.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Ahmad Dahlan yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Fajriah, S., Darmawan, A., Sundono, A. & Artanti, N. Isolasi Senyawa Antioksidan dari Ekstrak Etil Asetat Daun Benalu *Dendrophthoe pentandra* L. Miq yang Tumbuh pada Inang Lobi-Lobi. *J. Kim. Indones.* **2**, 17–20. 2007.
2. Saupi, N., Zakaria, M. H. & Bujang, J. S. Analytic Chemical Composition and Mineral Content of Yellow Velvetleaf (*Limnopharis flava* L. Buchneu)'s Edible Part. *J. Appl. Sci.* **9**, 2969–2974. 2009.
3. Rusydi, R. Analisis Mikroskopis dan Komponen Bioaktif Tanaman Genjer (*Limnopharis flava*) dari Kelurahan Situ Gede Bogor. *Skripsi*. Departemen Teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 2010.
4. Maisuthisakul, P., Pasuk, S. & Ritthiruangdej, P. Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants. *J. Food Compos. Anal.* **21**, 229–240. 2008.
5. Permatasari, M. Perubahan aktivitas antioksidan tanaman genjer (*Limnopharis flava*) akibat pengukusan. *Skripsi* Departemen Teknologi Hasil Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 2012.
6. Ridwina, G. Perbandingan pengukuran aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol dan minyak atsiri lempuyang gajah. *Skripsi*. Departemen Kimia. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor. 2008.
7. Ridlawati. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas ekstrak etanol daun genjer segar dan kukus (*Limnopharis flava*) dengan metode DDPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *Skripsi*. Fakultas Farmasi. Universitas Ahmad Dahlan. Yogyakarta. 2012.
8. Salamah, N. & Farahana, L. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol herba pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) dengan metode Fosfomolibdat. *Pharmaciana* **4**, 23–30. 2014.

9. Emilan, T., Kurnia, A., Utami, B., Diyani, L. N. & Maulana, A. Konsep Herbal Indonesia. *Laporan*. Departemen Farmasi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia. 2011.
10. Ferrero, A., Minetti, A., Bras, C. & Zanetti, N. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of *Schinus molle* in rats. *J. Ethnopharmacol.* **113**, 441–447. 2007.
11. Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T. & Terao, J. HPLC method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **62**, 1201–1204. 1998.