

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN (METODE DPPH) EKSTRAK METANOL DAN FRAKSI-FRAKSINYA DARI DAUN RUMPUT KNOP (*Hyptis capitata* Jacq.)

TEST OF ANTIOXIDANT ACTIVITY (DPPH METHOD) OF METHANOL EXTRACT AND ITS FRACTIONS FROM LEAVES OF KNOBWEED (*Hyptis capitata* Jacq.)

Nur Endah Zuliani^{*1}, Erwin¹, Irawan Wijaya Kusuma²

¹Program Studi S1 Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Mulawarman
Jalan Barong Tongkok No. 4 Kampus Gunung Kelua, Samarinda, 75123

²Fakultas Kehutanan, Universitas Mulawarman, Samarinda
Jalan Penajam Kampus Gunung Kelua Samarinda-Indonesia

*E-mail: znurendah@gmail.com

Received: 30 January 2019, Accepted: 20 March 2019

ABSTRACT

Test of antioxidant activity of methanol extract and its fractions from leaves of Knobweed (*Hyptis capitata* Jacq.) were carried out. This research was conducted to determine antioxidant activity in the fractions resulting from column chromatography separation. Antioxidant activity test was carried out by DPPH method while phytochemical was carried out by test colour of TLC method. The results of the first column chromatographic separation produced 18 fractions. The results of the first column antioxidant activity test showed that the value of antioxidant activity ranged from 0.923-81.849% at a sample concentration of 100 ppm. The second column chromatographic separation was carried out in fraction 16. The results of the second column antioxidant activity test produced 18 fractions. The results of the second column antioxidant activity test showed that the value of antioxidant activity ranged from 10.384-59.769% at a sample concentration of 50 ppm. The second column antioxidant activity test produced fraction 15 and fraction 16 showed IC₅₀ values of 40.321 and 56.812 ppm respectively. Phytochemical test results showed that fraction 15 and fraction 16 contained alkaloid compounds, flavonoids, polyphenols and steroids/terpenoids.

Keywords: Antioxidant, Knobweed (*Hyptis capitata* Jacq), Column Chromatography, Antioxidants, DPPH, Secondary Metabolites

PENDAHULUAN

Sejak zaman dahulu, ciri budaya masyarakat ialah masih dominannya unsur-unsur tradisional untuk memenuhi kehidupan sehari-hari. Sebagai contoh ialah seperti pemanfaatan tumbuhan yang berada di alam yang bermanfaat sebagai pengobatan tradisional. Salah satu produk pangan fungsional yang terus mengalami perkembangan adalah pangan yang kaya akan antioksidan [1].

Senyawa yang berperan dalam proses penghambatan oksidasi ialah antioksidan, di mana penghambatan dilakukan dengan cara menangkap radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang menyebabkan instabilitas serta bersifat reaktif yang mengakibatkan kerusakan sel, gangguan fungsi sel bahkan kematian sel [2].

Berbagai tumbuhan Indonesia mempunyai banyak kandungan antioksidan, sehingga pemanfaatan tumbuhan sebagai antioksidan. Rumput

Knop (*Hyptis capitata* Jacq.) merupakan tumbuhan yang berpotensi sebagai obat. Daun Rumput Knop bermanfaat dalam menyembuhkan mimisan dan luka bakar. Namun, pemanfaatan tumbuhan Rumput Knop masih sangatlah rendah [3].

Berdasarkan uraian di atas penulis tertarik untuk melakukan penelitian Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Fraksi-fraksinya Daun Hiptis (*Hyptis capitata* Jacq.) dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah botol maserasi, pengaduk kayu, corong kaca, seperangkat rotary vacuum evaporator, oven vakum, neraca analitik, seperangkat alat kromatografi kolom, tabung reaksi, Chamber, lampu UV,

spektrofotometer UV-Vis, pipet mikro 1000 μL , pipet mikro 100 μL , botol semprot.

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Daun Rumput Knop (*Hyptis capitata* Jacq.), metanol, *n*-heksana, etil asetat, etanol 96%, diklorometana, aseton, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl), dimetil sulfoksida (DMSO), plat KLT (Silika gel F₂₅₄), serum (IV) sulfat, FeCl₃, akuades.

Prosedur Penelitian

Pemisahan dengan kromatografi kolom

Ekstrak pekat metanol daun rumput knop (*Hyptis capitata* Jacq.) yang telah dilarutkan dengan menggunakan pelarut aseton kemudian sampel ditotolkan pada plat KLT. Setelah kering, dilakukan pengelusian di dalam *chamber* dan ditutup rapat. Eluen yang digunakan yaitu *n*-heksana:etil asetat (9:1) dan etil asetat:etanol (9:1) setelah eluen mencapai batas atas plat yang digunakan dikeluarkan dan dikeringkan. Hasil dari KLT diamati menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm.

Ekstrak pekat dimasukkan ke dalam kolom dan dielusi dengan menggunakan eluen berdasarkan kepolaran yang meningkat dari non polar hingga polar, yaitu 100% *n*-heksana hingga 100% etil asetat, 100% etil asetat hingga 100% etanol dan 100% metanol. Fraksi-fraksi yang telah diperoleh ditampung dalam tabung reaksi yang kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisa dengan KLT. Hasil KLT fraksinasi yang memiliki nilai R_f yang hampir sama di gabung dalam satu wadah sehingga diperoleh fraksi gabungan yang selanjutnya diidentifikasi aktivitas antioksidan.

Uji pendahuluan

Kristal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) sebanyak 6 mg dilarutkan dengan 25 mL etanol dan dimasukkan ke dalam botol semprot. Masing-masing fraksi hasil kromatografi kolom dianalisa dengan KLT kemudian dilarutkan penyemprotan larutan DPPH.

Uji aktivitas antioksidan

Pembuatan larutan DPPH 0,068 mM

Kristal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) sebanyak 2,7 mg dilarutkan dengan 100 mL etanol dan diletakkan ke dalam *refrigerator*.

Pembuatan larutan uji 3000 ppm

Sebanyak 1,5 mg fraksi sampel masing-masing dilarutkan dengan 500 μL DMSO.

Penentuan persen peredaman

Metode yang digunakan berdasarkan pada penelitian oleh (Shimizu *et al.*, 2001). Masing-masing fraksi sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 33 μL , ditambahkan 467 μL etanol dan 500 μL DPPH. Sedangkan pada kontrol negatif sampel diganti menggunakan DMSO.

Sampel dihomogenkan dan diinkubasi selama 20 menit di dalam ruangan minim cahaya dengan suhu kamar. Aktivitas antioksidan ditentukan melalui dekolorisasi dari DPPH dengan panjang gelombang optimum 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Pemisahan dengan kromatografi kolom fraksi 16

Fraksi 16 dimasukkan ke dalam kolom kromatografi dan dielusi dengan menggunakan eluen 100 % diklorometana, diklorometana:metanol (98:2, 96:4, 94:6, 92:8, 90:10) dan 100 % metanol. Fraksi-fraksi yang telah diperoleh ditampung dalam tabung reaksi yang kemudian dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisa dengan KLT. Hasil KLT fraksinasi yang memiliki nilai R_f yang hampir sama di gabung dalam satu wadah sehingga diperoleh fraksi gabungan yang selanjutnya diidentifikasi aktivitas antioksidan.

Uji aktivitas antioksidan fraksi 16

Pembuatan larutan DPPH 0,068 mM

Kristal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl) sebanyak 2,7 mg dilarutkan dengan 100 mL etanol dan diletakkan ke dalam *refrigerator*.

Pembuatan larutan uji fraksi 15 dan fraksi 16

Fraksi sampel sebanyak 1,5 mg masing-masing dilarutkan dengan 500 μL DMSO. Dengan demikian konsentrasi larutan masing-masing fraksi diperoleh sebesar 3000 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 1500 ppm, 750 ppm, 375 ppm dan 187,5 ppm.

Pembuatan larutan vitamin C

Vitamin C sebanyak 0.5 mg dilarutkan dengan 1000 μL DMSO. Dengan demikian konsentrasi larutan vitamin C diperoleh sebesar 500 ppm. Kemudian dilakukan pengenceran menjadi 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dan 31,25 ppm.

Penentuan persen peredaman

Metode yang digunakan berdasarkan pada penelitian oleh (Shimizu *et al.*, 2001). Masing-masing fraksi sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 33 μL , ditambahkan 467 μL etanol

dan 500 μL DPPH. Sedangkan pada kontrol negatif sampel diganti menggunakan DMSO.

Sampel dihomogenkan dan diinkubasi selama 20 menit di dalam ruangan minim cahaya dengan suhu kamar. Aktivitas antioksidan ditentukan melalui dekolonisasi dari DPPH dengan panjang gelombang optimum 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Uji fitokimia

Fraksi hasil kromatografi kolom dengan aktivitas antioksidan tertinggi dilarutkan dengan menggunakan pelarut aseton kemudian sampel ditotolkan pada plat. Setelah kering, dilakukan pengelusan di dalam *chamber* dan ditutup rapat. Eluen yang digunakan diklorometana:metanol (9,2:0,8) setelah eluen mencapai batas atas plat yang digunakan dikeluarkan dan dikeringkan. Hasil dari KLT diamati menggunakan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dengan menggunakan pereaksi-pereaksi spesifik untuk menampakan noda pada plat.

Teknik analisis data

Persentase aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-*diphenyl-2-picrylhydrazyl*) dinyatakan dalam bentuk persentase peredaman, dimana dapat dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

Dimana: A_0 = Rata-rata absorbansi kontrol negatif (tanpa ekstrak)

A_t = Rata-rata absorbansi sampel uji (dengan ekstrak)

Korelasi antara persen peredaman dengan konsentrasi ekstrak diplotkan dan nilai IC_{50} dihitung dalam persamaan regresi linier $y = ax \pm b$, dimana y sebesar 50 merupakan penghambatan 50% oksidasi dan x sebagai nilai IC_{50} .

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Pendahuluan

Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan dilakukan terhadap fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom. Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom didapatkan 18 fraksi. Masing-masing fraksi dianalisa dengan KLT dan didapatkan hasil noda berwarna kuning pucat dengan latar warna ungu. Terbentuknya bercak kuning pucat setelah penyemprotan

disebabkan oleh adanya senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen di dalam fraksi, sehingga dapat menyebabkan DPPH tereduksi yang diikuti dengan perubahan warna ungu menjadi kuning [4].

Uji Aktivitas Antioksidan

Pemisahan kromatografi kolom pertama menghasilkan 18 fraksi. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan persentase aktivitas antioksidan berkisar antara 0,923-81,849% pada konsentrasi 100 ppm. Nilai persentase menunjukkan bahwa penurunan nilai absorbansi menyebabkan terjadinya peningkatan nilai persentase peredaman. Penurunan absorbansi menunjukkan peningkatan kemampuan peredaman radikal bebas DPPH yang berarti bahwa konsentrasi yang tinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi [5].

Pemisahan dilanjutkan kembali pada fraksi 16 dengan nilai persentase peredaman sebesar 74,452%. Pemisahan kromatografi kolom kedua menghasilkan 18 fraksi. Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan persentase aktivitas antioksidan berkisar antara 10,384-59,769 pada konsentrasi 50 ppm dengan nilai persentase peredaman tertinggi ada pada fraksi 15 sebesar 59,769% dan fraksi 16 sebesar 55,615%.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antioksidan hasil kolom fraksi 16, dilakukan kembali uji aktivitas antioksidan terhadap fraksi dengan nilai % peredaman yang tinggi yaitu fraksi 15 dan fraksi 16. Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan untuk mendapatkan nilai IC_{50} . Hasil uji aktivitas antioksidan ditunjukkan pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antioksidan

Jenis Ekstrak	Nilai IC_{50} (ppm)
Fraksi 15	40,321
Fraksi 16	56,812
Vitamin C	2,041

Parameter yang digunakan untuk uji penangkapan radikal DPPH adalah nilai IC_{50} (*Inhibition Concentration 50*), yaitu konsentrasi fraksi uji yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebesar 50 %. Kategori tingkat IC_{50} menyatakan bahwa nilai ($IC < 50$ ppm) maka senyawa tersebut merupakan antioksidan sangat kuat, aktivitas kuat untuk ($IC 50-100$ ppm), aktivitas sedang untuk ($IC 100-250$ ppm) dan aktivitas lemah untuk ($IC 250-500$ ppm) [6].

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh pada fraksi 15, fraksi 16 dan vitamin C yaitu berturut-turut sebesar 40,321; 56,812 dan 2,041 ppm. Semakin

kecil nilai IC₅₀ yang diperoleh maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkap radikal bebas. Pada fraksi 15 diketahui memiliki daya sangat kuat sebagai antioksidan dan pada fraksi 16 diketahui memiliki daya kuat sebagai antioksidan. Sehingga untuk mengetahui kebenaran tersebut dilakukanlah uji fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam fraksi.

Vitamin C digunakan sebagai pembanding karena memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dikarenakan memiliki 2 gugus hidroksi (-OH) pada ikatan rangkapnya yang mudah mengalami oksidasi oleh radikal bebas, selain itu vitamin C tidak melalui proses ekstraksi dan fraksinasi sehingga aktivitas antioksidan yang diperoleh lebih tinggi [7].

Uji Fitokimia

Data yang dihasilkan dari uji fitokimia metode KLT pada fraksi 15 dan fraksi 16 diidentifikasi dengan cara mengamati bercak yang tampak pada KLT secara visual dengan. Hasil uji fitokimia pada fraksi 15 dan fraksi 16 menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder yang dapat dilihat pada tabel 2.

Adanya aktivitas antioksidan pada fraksi diduga karena adanya senyawa fenolik seperti flavonoid dan polifenol pada fraksi yang di mana senyawa tersebut merupakan komponen bioaktif yang bersifat polar sehingga ikut larut dalam fraksi yang juga bersifat polar. Telah umum diketahui bahwa senyawa fenolik memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidan. Senyawa flavonoid cenderung bersifat polar dikarenakan golongan senyawa fenolik umumnya mempunyai ciri adanya aromatik yang mengandung satu atau lebih gugus OH dan cenderung mudah larut dalam air sehingga memiliki sifat polar [8].

Flavonoid memiliki beberapa efek, diantaranya dapat menekan kerusakan jaringan, menghambat peroksidasi lipid dan menghambat beberapa enzim. Telah umum diketahui bahwa senyawa flavonoid memberikan kontribusi nyata terhadap aktivitas antioksidan tumbuhan. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi serta memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas [9].

Tabel 2. Hasil uji fitokimia fraksi 15 dan fraksi 16

Fraksi	Metabolit Sekunder	Harga Rf	Warna Noda pada Kromatogram
Fraksi 15	Alkaloid	0,58	Coklat
	Polifenol	0,14	Biru Kehitaman
		0,42	Hitam
	Flavonoid	0,11	Coklat
		0,48	Coklat muda
	Steroid/ Terpenoid	0,08	Ungu
0,25		Ungu	
Fraksi 16	Alkaloid	0,62	Coklat
	Polifenol	0,14	Biru Kehitaman
		0,22	Hitam
	Flavonoid	0,42	Coklat
		0,17	Ungu
	Steroid/ Terpenoid	0,08	Ungu
0,17		Ungu	

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi 15 dan fraksi 16 secara berturut-turut memiliki tingkat aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 40,321 ppm berpotensi sangat kuat dan 56,812 ppm berpotensi kuat sebagai antioksidan. Hasil metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi 25 dan fraksi 16 yaitu alkaloid, polifenol, flavonoid dan steroid

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Adawiah, Sukandar, D. dan Muawanah, A. 2015. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam. *Jurnal Kimia Valensi: Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmi Kimia*, 1(2), pp.130–136.
- [2] Andriani, Y. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Betaglukan Dari *Saccharomyces Cerevisiae*. *Gradien*, 3(1), pp. 226–230.

- [3] Arham, S., Khumaidi, A. dan Pitopang, R. 2016. Keanekaragaman jenis tumbuhan obat tradisional dan pemanfaatannya pada suku kulawi di desa mataue kawasan taman nasional lore lindu. *Jurnal Biocelebes*, 10(2), pp. 01-16.
- [4] Gandjar, G. H. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- [5] Amrun, M., dan Umiyah. 2005. Pengujian Antiradikal Bebas Difenilpicril Hidrazil (DPPH) Ekstrak Buah Kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dari Daerah Jember. *Jurnal Ilmu Dasar VI*, (2), pp. 110–112.
- [6] Putri, A. A. S. dan Hidajati, N. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *Unesa Journal of Chemistry*, 4(1), pp. 1–6.
- [7] Kumalaningsih, S. 2006. *Antioksidan Alami*. Jakarta: Trubus Agri Sarana.
- [8] Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia: Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: ITB Press.
- [9] Middleton, E., Kandawami, dan Theoharides, T. 1998. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease and Cancer. *Pharmacological Review*, 52, pp. 673-751.