

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BERBAGAI FRAKSI DAN EKSTRAK METANOLIK DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* Less)

Antioxidant Activities of Various Fractions and Methanolic Extract of Beluntas (*Pluchea Indica* Less) Leaves

Paini Sri Widyawati¹, Hanny Wijaya², Peni Suprpti Harjosworo³, Dondin Sajuthi⁴

¹Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl Dinoyo 42-44 Surabaya

²Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Gedung Fateta Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

³Fakultas Peternakan, Institut Pertanian Bogor, Jl. Agatis Kampus IPB Darmaga Bogor 16680

⁴Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor, Jl. Lodaya II/5 Bogor 16151

Email: wiewiedt@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan berbagai fraksi dan ekstrak metanolik daun beluntas dengan berbagai sistem uji, seperti aktivitas menangkap radikal DPPH, superoksida, hidroksil dan hidrogen peroksida, mereduksi ion besi, mengkelat ion besi dan hemoglobin (Hb) dan menghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak metanolik daun beluntas (EMB) dan fraksi-fraksinya (etil asetat (FEA), air (FA) dan n-butanol (FNB)) berpotensi menangkap radikal bebas DPPH. EMB mempunyai kadar fenolik total dan kekuatan reduksi tertinggi lebih berpotensi menangkap radikal superoksida, mereduksi ion besi dan menghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten, sedangkan fraksi etil asetat (FEA) mempunyai aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan menangkap radikal superoksida, mereduksi ion besi, mengkelat ion besi dan hemoglobin.

Kata kunci: Aktivitas antioksidan, fraksi dan ekstrak daun beluntas

ABSTRACT

This study has been done to investigate the antioxidant activity of various fractions and methanolic extract of beluntas leaves by using several test system, such as DPPH, superoxide and hydroxyl radical-scavenging activities, hydrogen peroxide scavenging activity, ferric reducing power, iron and haemoglobin chelating capacities and β -carotene–linoleic bleaching assay. The results showed that methanolic extract of beluntas leaves (EMB) and its fractions (ethyl acetate fraction (FEA), water fraction (FA) and n-butanol fraction (FNB)) had scavenging activity of DPPH radical. EMB which had highest phenolic content and the strongest ferric reducing power, exhibited β -carotene–linoleic bleaching inhibition and the highest superoxide scavenging activity, while FEA showed antioxidant activity based on superoxide radical-scavenging activity, iron and haemoglobin chelating capacities and ferric reducing power.

Keywords: antioxidant activity, fraction and extract of *Pluchea indica* Less leaves

PENDAHULUAN

Beluntas (*Pluchea indica* Less) termasuk famili *Asteraceae* yang telah dimanfaatkan sebagai pangan dan obat tradisional (Ardiansyah dkk., 2003). Penelitian sebelumnya menginformasikan bahwa daun beluntas mengandung sejumlah senyawa fitokimia seperti lignan, terpen, fenilpropanoid, benzoid, alkana (Luger dkk., 2000), sterol, 2-(prop-1-unil)-5-(5,6-dihidroksi heksa-1,3-diunil)-

thiofena, (-)-katekin (Biswas dkk., 2005), fenol hidrokuinon, saponin, tanin, dan alkaloid (Ardiansyah dkk., 2003), flavonol (kuersetin, kaemferol, mirisetin, luteolin, apigenin) (Andarwulan dkk., 2010).

Pada umumnya senyawa fitokimia, terutama fenolik yang terdapat dalam sel tanaman berbentuk bebas atau glikosida (Dehkharghanian dkk., 2010). Adanya gugus hidroksil pada senyawa fenolik menyebabkan senyawa ini bersifat polar yang dapat terekstrak oleh pelarut polar (Lai

dkk., 2009). Etanol dan metanol merupakan pelarut organik polar yang dapat mengekstrak senyawa fenolik berbentuk glikosida (Houghton dan Raman 1998). Ekstrak etanolik daun beluntas telah terbukti mempunyai kemampuan menangkap radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrasil (DPPH) (Widyawati, 2004), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), mereduksi ion besi dan mencegah pemucatan asam linoleat- β -karoten (Andarwulan dkk., 2010). Metanol cukup efektif mengekstrak senyawa fenolik dengan berat molekul rendah dengan tingkat kepolaran sedang sehingga dihasilkan rendemen dan aktivitas antioksidan yang tinggi dari daun spesies *Etilingera* (Chan dkk., 2007).

Fraksinasi ekstrak metanolik dengan berbagai pelarut yang berbeda kepolaran, seperti etil asetat, n-butanol, dan air dilakukan untuk mendapatkan rendemen dengan komposisi senyawa antioksidan sesuai sifat pelarut (Lai dkk., 2009). Etil asetat dapat mengekstrak alkaloid, aglikon, dan glikosida (Houghton dan Raman 1998), senyawa fenolik dengan berat molekul rendah hingga tinggi (Mariod dkk., 2010). n-Butanol dapat mengekstrak senyawa polar, seperti glikosida, aglikon, dan gula (Liu dkk., 2011). Sedangkan air dapat mengekstrak senyawa polar, seperti aglikon, glikosida, asam amino, dan gula (Houghton dan Raman 1998).

Ekstrak metanolik daun beluntas dan fraksi-fraksi diharapkan dapat digunakan sebagai antioksidan alami untuk mencegah *warmed over flavor* (WOF) daging itik, dimana hingga saat ini belum banyak dikaji. Hal ini seiring dengan penurunan pemakaian antioksidan sintetis pada produk pangan dengan semakin meningkatnya kesadaran masyarakat terhadap kesehatan (Valentão dkk., 2010). Oleh karena itu perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dari berbagai fraksi dan ekstrak metanolik daun beluntas terhadap berbagai sistem uji, seperti aktivitas menangkap radikal DPPH, superoksida, hidroksil dan hidrogen peroksida, mereduksi dan mengkelat ion besi, mengkelat hemoglobin (Hb) dan mencegah pemucatan asam linoleat- β -karoten.

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Daun beluntas diperoleh dari daerah Dramaga, Bogor. Teh hijau disuplai oleh *Tea Factory* di Singapura (Lim Lam Thye PTE, LTD). Rosemary kering dibeli di *cold storage supermarket* di Holland Evanue, Singapura. Darah ayam diperoleh dari pemotongan ayam di pasar tradisional Laladon, Bogor. Bahan kimia yang digunakan untuk preparasi daun beluntas dan analisis adalah pro analisis (*analytical grade*), yang diperoleh dari Sigma, Merck, JT Baker dan Riedel-de Haen, kecuali etanol (PT Brataco) dan akuades yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi SEAFast-PAU-IPB.

Persiapan Ekstrak dan Fraksi Daun Beluntas

Ekstraksi daun beluntas dilakukan berdasarkan modifikasi metode Dorman dan Hiltunen (2004) (Gambar 1). Daun beluntas ruas 1-6 setelah dibersihkan dan dikeringkan pada suhu kamar selama 7 hari, ditepungkan dengan ukuran 40 mesh. Selanjutnya dimaserasi dengan petroleum eter (1:4 b/v) selama 24 jam, lalu difiltrasi. Residu kering yang diperoleh diekstraksi soxhlet dengan metanol (1:15 b/v) pada suhu 65 °C selama 3 jam. Ekstrak metanolik daun beluntas yang telah diuapkan pelarutnya (EMB) difraksinasi metode ekstraksi pelarut-pelarut dengan etil asetat dan akuades (1:1 v/v), selanjutnya fasa air difraksinasi lagi dengan n-butanol (1:1 v/v). Masing-masing fraksi diuapkan pelarutnya untuk mendapatkan fraksi etil asetat (FEA), fraksi air (FA) dan fraksi n-butanol (FNB). Ekstrak daun beluntas dan fraksi-fraksinya selanjutnya disimpan pada suhu 4 °C dan gelap sampai analisa berikutnya.

Penentuan Kadar Air

Daun beluntas yang sudah dikeringkan diukur kadar airnya berdasarkan metode AOAC (1990).

Penentuan Rendemen

Ekstrak metanolik daun beluntas (EMB) dan fraksi-fraksinya ditentukan rendemennya berdasarkan metode gravimetri menurut Ljubuncic dkk. (2005), dengan cara membandingkan berat EMB terhadap berat daun beluntas kering atau fraksi-fraksi terhadap EMB yang digunakan.

Penentuan Fitokimia

Fitokimia yang terdapat dalam EMB dan fraksi-fraksinya ditentukan berdasarkan metode Harborne (1996).

Penentuan Fenolik Total

Fenolik total dalam fraksi dan ekstrak ditentukan dengan metode Manian dkk. (2008) menggunakan pereaksi Folin ciocalteu fenol. Hasil dinyatakan sebagai milligram ekivalen asam gallat (GAE) per 100 gram berat kering daun beluntas (bk). Kompleks senyawa berwarna biru yang diperoleh diukur pada λ 760 nm.

Penentuan Flavonoid Total

Flavonoid total fraksi dan ekstrak metanolik ditentukan berdasarkan metode Manian dkk. (2008) menggunakan pereaksi NaNO_2 - AlCl_3 - NaOH , hasil dinyatakan sebagai milligram ekivalen katekin (CE) per 100 gram berat kering daun beluntas. Kompleks senyawa berwarna merah yang diperoleh diukur pada λ 510 nm.

Aktivitas Menangkap Radikal Bebas DPPH

Aktivitas menangkap radikal DPPH diukur berdasarkan metode Manian dkk., (2008). Penurunan warna ungu akibat penambahan larutan DPPH (60 μ M) dalam metanol diukur absorbansi pada λ 517 nm setelah 30 menit. Nilai penghambatan DPPH (%) dihitung berdasarkan $= (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \%$, dengan A_0 adalah absorbansi kontrol pada saat $t = 0$ detik dan A_t adalah absorbansi antioksidan pada saat t . Nilai penghambatan DPPH (%) versus konsentrasi ekstrak digunakan untuk menentukan kemampuan menangkap 50 % radikal DPPH dalam medium uji (IC_{50}). IC_{50} merupakan ukuran kemampuan antioksidan berdasarkan konsentrasi ekstrak yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal DPPH hingga 50%.

Aktivitas Menangkap Radikal Superoksida

Aktivitas menangkap radikal superoksida didasarkan metode Manian dkk. (2008). Radikal superoksida diperoleh dari reaksi antara NBT-NADH-PMS, kompleks warna biru (formazan) yang dihasilkan diukur absorbansi pada λ 560 nm. Nilai penghambatan (%) radikal superoksida dihitung berdasarkan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Aktivitas Menangkap Radikal Hidroksil

Aktivitas menangkap radikal hidroksil didasarkan metode Manian dkk. (2008). Radikal hidroksil dihasilkan dari sistem Fe-EDTA-DMSO-asam askorbat. Intensitas warna kuning yang terbentuk diukur pada λ 412 nm setelah 15 menit. Nilai penghambatan radikal hidroksil (%) dihitung berdasarkan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Aktivitas Menangkap Hidrogen Peroksida

Aktivitas menangkap hidrogen peroksida berdasarkan metode Manian dkk. (2008). Potensi menangkap hidrogen peroksida dapat terlihat dari penurunan absorbansi larutan pada λ 230 nm. Nilai penghambatan hidrogen peroksida (%) dihitung berdasarkan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Kemampuan Mereduksi Ion Besi

Kemampuan mereduksi ion besi berdasarkan metode Manian dkk. (2008). Potensi mereduksi ion Fe^{3+} menjadi ion Fe^{2+} ditunjukkan dengan terbentuknya kompleks warna larutan hijau-biru yang terbentuk dapat terdeteksi pada λ 700 nm setelah ditambah pereaksi kalium ferrisianat. Peningkatan intensitas warna biru menunjukkan kemampuan mereduksinya semakin besar.

Aktivitas Mengikat Hemoglobin

Aktivitas mengikat hemoglobin (Hb) berdasarkan metode Bate-Smith (1977). Absorbansi kompleks warna merah karena terbentuknya kompleks Hb-antioksidan dapat terdeteksi pada λ 562 nm. Semakin tinggi absorbansi menunjukkan kemampuan kelating antioksidan semakin besar yang dapat terdeteksi pada λ 578 nm. Nilai pengikatan hemoglobin (%) dihitung dengan persamaan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Aktivitas Mengkelat Ion Besi (II)

Aktivitas mengkelat ion besi (II) ditentukan menurut metode Manian dkk. (2008). Penurunan kompleks warna ungu-kemerahan (magenta) karena terbentuknya kompleks Fe^{2+} -Ferrozine dapat terdeteksi pada λ 562 nm. Nilai pengkelatan terhadap ion besi (II) (%) dihitung dengan persamaan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Kemampuan Menghambat Pemucatan Asam Linoleat- β -Karoten

Kemampuan menghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten didasarkan metode Manian dkk. (2008). Penurunan intensitas warna orange karena oksidasi β -karoten dapat diukur pada λ 470 nm. Nilai penghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten (%) dihitung dengan persamaan $= [(AC - AS) / AC] \times 100 \%$, dengan AC adalah absorbansi kontrol dan AS adalah absorbansi sampel.

Pengujian Statistik

Hasil penelitian dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD dari dua pengukuran secara paralel. Data dianalisis dengan *analysis of variance* (ANOVA) dan rata-rata diuji dengan *Duncan's multiple range test* (DMRT). Hasil diproses dengan program computer *Excel* and *Statistica software SPSS versi 17*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kadar Air dan Rendemen

Daun beluntas ruas 1-6 yang dikeringkan mempunyai kadar air sebesar 10,38 %. Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa daun beluntas dengan ruas 1-6 mempunyai aktivitas menangkap radikal bebas DPPH lebih tinggi secara nyata dibandingkan dengan ruas daun >6. Daun beluntas kering yang telah dihilangkan kandungan lipidanya dengan petroleum eter, diekstraksi dengan metanol diperoleh rendemen ekstrak metanolik daun beluntas (EMB) sebesar

15,22 % bk atau 13,64 % bb (Tabel 1). Rendemen EMB pada kondisi segar diperoleh lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etanol yaitu sebesar 1,40 % bb (Widyawati, 2004), seperti yang dijelaskan oleh Chan dkk. (2007) bahwa metanol cukup efektif mengekstrak fenolik tanaman dan menghambat *polifenol oksidase* yang dapat mempengaruhi aktivitas antioksidan.

Fraksinasi EMB dengan berbagai pelarut yang berbeda kepolaran (etil asetat, n-butanol dan air) diperoleh hasil bahwa sebagian besar komponen terekstrak dalam EMB bersifat sangat polar>semipolar>polar, yang ditunjukkan oleh rendemen pada fraksi air (FA)>fraksi etil asetat (FEA)>fraksi n-butanol (FNB). Hal ini diperkirakan sebagian besar komponen aktif yang terkandung dalam EMB bersifat sangat polar, seperti aglikon, glikosida, asam amino, dan gula, seperti yang dijelaskan oleh Houghton dan Raman (1998).

Fitokimia, Fenol Total dan Flavonoid Total

Hasil uji fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa kandungan fitokimia pada EMB, FEA dan FNB adalah sama (Tabel 2), sedangkan pada FA tidak mengandung sterol. Perbedaan tingkat kepolaran pelarut menentukan komposisi jenis fitokimia (Dehkharghanian dkk., 2010).

Kadar fenolik total (PT) dan flavonoid total (FT) EMB lebih tinggi secara signifikan dibandingkan fraksi-fraksi lainnya (Tabel 1), hal ini disebabkan metanol merupakan pelarut yang efektif dalam mengekstrak senyawa antioksidan dengan kadar fenolik total lebih tinggi dibandingkan pelarut lain, seperti yang dijelaskan oleh Chan dkk. (2007). Kadar PT dan FT pada FEA lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kedua fraksi lainnya (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa fenolik yang terkandung pada EMB bersifat semipolar. Hal ini disebabkan etil asetat dapat mengekstrak senyawa fenolik dengan berat molekul rendah hingga tinggi dengan tingkat kepolaran sedang (Mariod dkk., 2010) dalam bentuk aglikon maupun glikosida (Houghton dan Raman 1998).

Aktivitas Menangkap Radikal DPPH

Ekstrak metanolik beluntas (EMB) dan fraksi-fraksinya menunjukkan aktivitas menangkap radikal bebas DPPH

Tabel 2. Senyawaan fitokimia yang terdeteksi pada ekstrak metanolik daun beluntas dan fraksinya

| Samples | Phytochemical content | | | |
|------------------------------|-----------------------|-----------|--------|--------------------|
| | Sterol | Flavonoid | Tannin | Phenol Hydroquinon |
| Methanolic Extract (EMB) | + | + | + | + |
| Ethyl Acetate Fraction (FEA) | + | + | + | + |
| Water Fraction (FW) | - | + | + | + |
| n-Butanol Fraction (FNB) | + | + | + | + |

Keterangan : + = senyawa terdeteksi, - = senyawa tidak terdeteksi

dibandingkan antioksidan kontrol, ekstrak metanolik teh hijau (EMT), ekstrak metanolik rosemary (EMR) dan BHT (Gambar 2). Fraksi etil asetat (FEA) (IC₅₀=3,33 mg/L) mempunyai kemampuan menangkap radikal DPPH lebih tinggi, sedangkan aktivitas terendah dimiliki oleh fraksi air (FA) (IC₅₀=7,95 mg/L). FEA juga menunjukkan kemampuan menangkap radikal bebas DPPH lebih efektif dari antioksidan kontrol EMR (IC₅₀=3,8 mg/L) dan BHT (IC₅₀=5,7 mg/L) tetapi kurang efektif dibandingkan EMT (IC₅₀=1,9 mg/L).

Potensi FEA sebagai penangkap radikal bebas DPPH diduga oleh keefektifannya senyawa fenolik yang bersifat semipolar dalam mendonorkan atom hidrogen pada radikal DPPH, sehingga terbentuk senyawa yang stabil DPPH-H (molekul pikrilhidrazin) berwarna kuning. Didukung oleh Manian dkk. (2008) maka senyawa fenolik dalam FEA berpotensi sebagai antioksidan primer. Berdasarkan kadar PT, FEA mempunyai kadar PT lebih rendah dari EMB tetapi mempunyai aktivitas menangkap radikal DPPH lebih tinggi, seperti yang dijelaskan oleh Huang dkk. (2010) bahwa senyawa antioksidan semipolar mempunyai aktivitas menangkap radikal DPPH lebih tinggi dibandingkan senyawa antioksidan polar dan sangat polar.

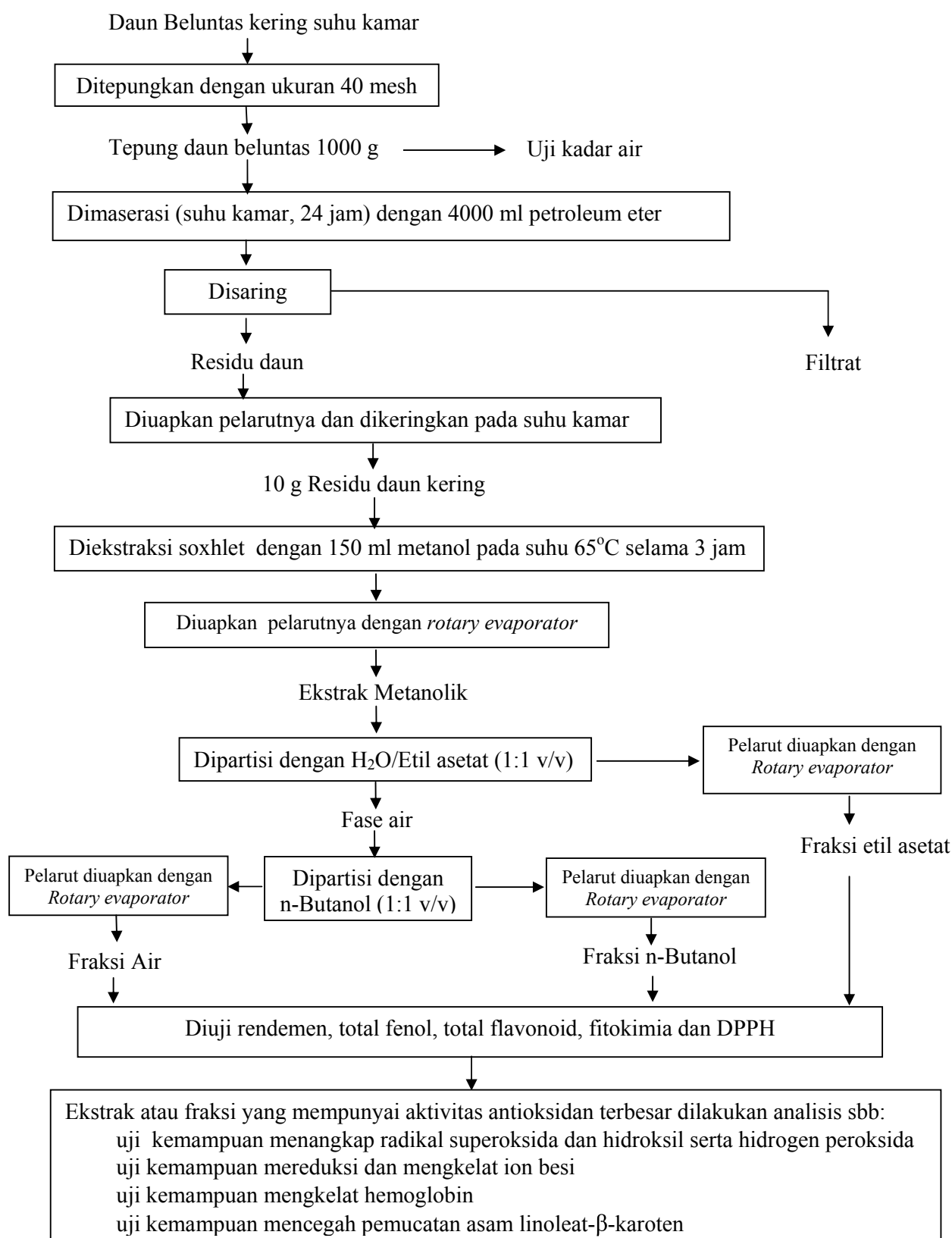
Aktivitas Menangkap Radikal Superoksida

Aktivitas menangkap radikal superoksida secara berturutan EMB (IC₅₀=2,5 mg/L)>alfa tokoferol (AT) (IC₅₀=3,3 mg/L)>FEA (IC₅₀=6,2 mg/L)> BHT (IC₅₀=9,1

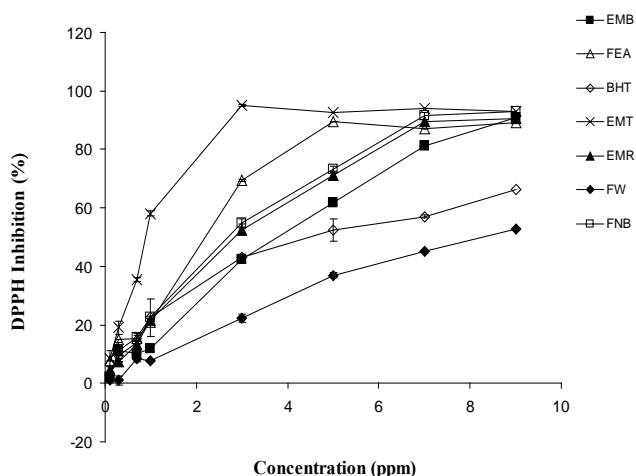
Tabel 1. Kadar rendemen, total fenol, dan total flavonoid pada ekstrak metanolik daun beluntas dan fraksinya

| Components | EMB | Fraksi | | |
|--|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | FEA | FA | FNB |
| Yield (%) | 15.22 | 30.48 | 44.54 | 14.87 |
| Total phenolic content (mg GAE/100 g db) | 314.01 ± 16.14 ^c | 126.97 ± 1.61 ^b | 42.58 ± 1.08 ^a | 55.63 ± 0.41 ^a |
| Total flavonoid content (mg CE/100 g db) | 116.38 ± 3.24 ^c | 57.11 ± 2.11 ^b | 41.54 ± 5.45 ^a | 38.49 ± 0.56 ^a |

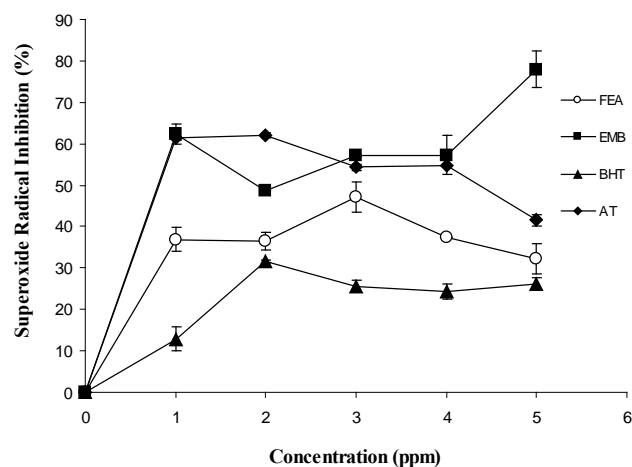
Keterangan: EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, FEA = fraksi etil asetat, FA = fraksi air, FNB = fraksi n-butanol, * = satuan % b/b daun beluntas bk, ** = satuan % b/b ekstrak metanolik daun beluntas, ^{a-c} = huruf superskrip pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan signifikan pada taraf 5%.



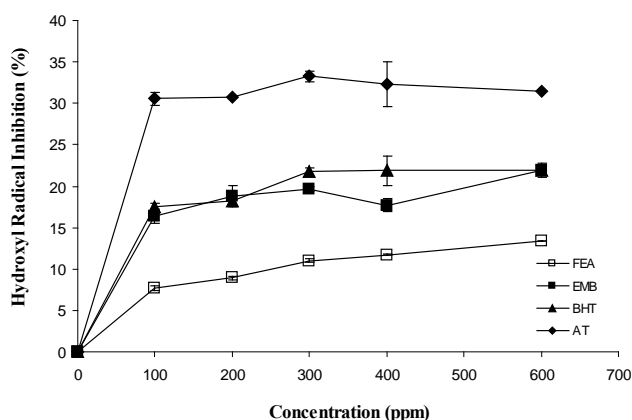
Gambar 1. Diagram alir proses ekstraksi dan pengujian aktivitas ekstrak metanolik daun beluntas dan fraksinya (Modifikasi Dorman dan Hiltunen 2004).



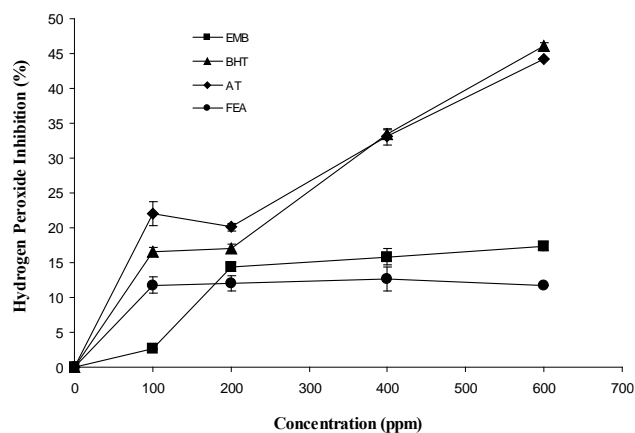
Gambar 2. Kemampuan menangkap radikal bebas DPPH dari senyawa antioksidan (EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, FEA = fraksi etil asetat, FNB = fraksi n-butanol, FA = fraksi air, EMT = ekstrak metanolik teh hijau, EMR = ekstrak metanolik rosemary, BHT = butil hidroksi toluena).



Gambar 3. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, BHT = butil hidroksi toluena, AT = α -tokoferol) menangkap radikal superoksida.



Gambar 4. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, BHT = butil hidroksi toluena, AT = α -tokoferol) menangkap radikal hidroksil.



Gambar 5. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik beluntas, BHT = butil hidroksi toluena, AT = α -tokoferol) menangkap hidrogen peroksida.

mg/L) (Gambar 3). EMB dan FEA menunjukkan potensi sebagai penangkap radikal superoksida dibandingkan antioksidan kontrol. Aktivitas antioksidan EMB dan FEA diperkirakan karena kemampuan senyawa fenolik, terutama flavonoid mampu mendonorkan atom hidrogen kepada radikal superoksida sehingga terbentuk molekul oksigen *triplet* yang stabil dan kurang reaktif. Tapas dkk. (2008) menjelaskan bahwa efektivitas flavonoid sebagai penangkap radikal bebas ditentukan oleh kemampuan struktur molekul flavonoid membentuk radikal yang terstabilkan oleh resonansi.

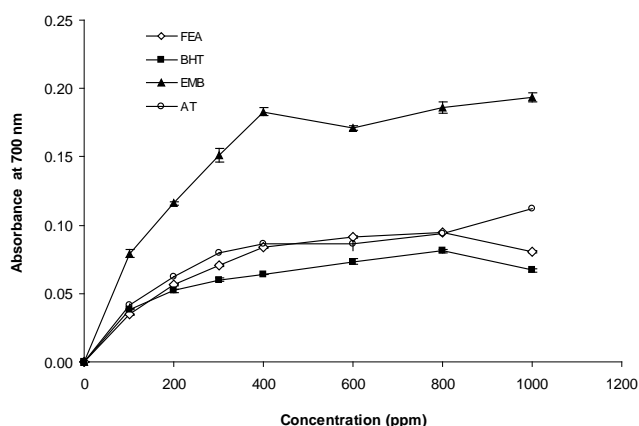
Aktivitas Menangkap Radikal Hidroksil

Aktivitas menangkap radikal hidroksil secara berturutan AT (IC_{50} = 896,16 mg/L) > BHT (IC_{50} = 1339,1 mg/L) > EMB

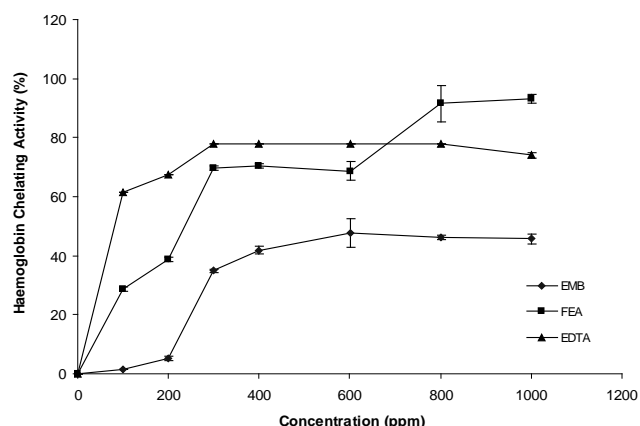
(IC_{50} = 1524,16 mg/L) > FEA (IC_{50} = 2402,67 mg/L) dan (Gambar 4). Berdasarkan IC_{50} menunjukkan bahwa EMB maupun FEA kurang berpotensi sebagai penangkap radikal hidroksil dibandingkan antioksidan kontrol.

Aktivitas Menangkap Hidrogen Peroksida

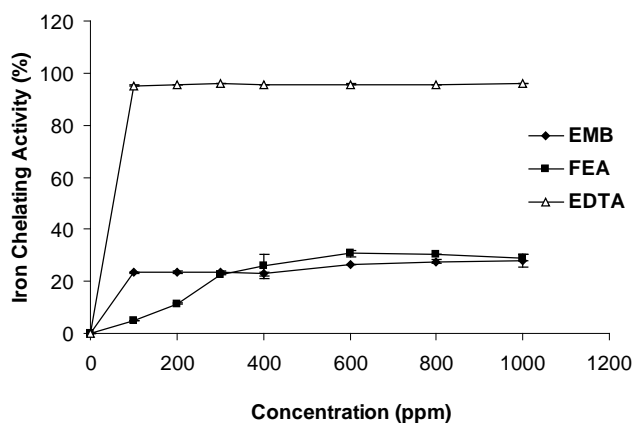
Aktivitas menangkap hidrogen peroksida menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan BHT (IC_{50} = 608,3 mg/L) sama dengan AT (IC_{50} = 666,2 mg/L) dan lebih kuat dibandingkan EMB (IC_{50} = 1575,3 mg/L) dan FEA (IC_{50} = 3404,1 mg/L), sedangkan aktivitas EMB lebih tinggi dari FEA (Gambar 5). EMB maupun FEA kurang berpotensi sebagai penangkap hidrogen peroksida dibandingkan antioksidan kontrol.



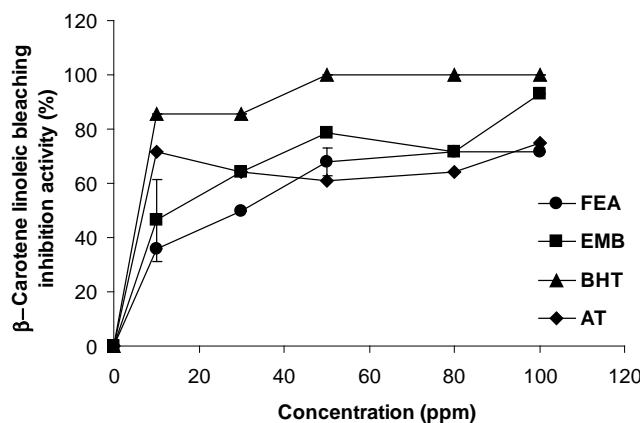
Gambar 6. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, BHT = butil hidroksi toluena, AT = α -tokoferol) mereduksi ion besi.



Gambar 7. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, EDTA = asam etilena diamina tetra asetat) mengkelat ion besi pada hemoglobin.



Gambar 8. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, EDTA = asam etilena diamina tetra asetat) mengkelat ion besi.



Gambar 9. Kemampuan senyawa antioksidan (FEA = fraksi etil asetat, EMB = ekstrak metanolik daun beluntas, BHT = butil hidroksi toluena, AT = α -tokoferol) menghambat oksidasi asam linoleat- β -karoten.

Kemampuan Mereduksi Ion Besi

Kapasitas reduksi EMB terhadap ion Fe^{3+} lebih tinggi secara signifikan dibandingkan FEA, BHT dan AT, sedangkan kapasitas mereduksi FEA, BHT dan AT sama (Gambar 6). Kapasitas reduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} oleh antioksidan disebabkan kemampuan senyawa ini mendonorkan elektron, yang ditandai oleh perubahan warna larutan dari kuning menjadi hijau-biru (Liu dkk., 2011). EMB dan FEA berpotensi sebagai pereduksi ion besi dibandingkan antioksidan kontrol. Kapasitas reduksi EMB dan FEA disebabkan oleh kemampuan senyawa fenolik dan flavonoid sebagai reduktor yang dapat menurunkan sifat ion Fe^{3+} sebagai katalis oksidasi (prooksidan). Manian dkk. (2008) menyatakan bahwa keberadaan reduktan dalam ekstrak mampu memutus rantai radikal bebas dengan mendonorkan atom hidrogen sehingga mampu mereduksi ion Fe^{3+} .

Aktivitas Mengkelat Hemoglobin (Hb) dan Ion Fe^{2+}

Fraksi etil asetat (FEA) mempunyai aktivitas pengkelat Hb dan ion besi lebih tinggi secara signifikan dibandingkan EMB, tetapi kemampuan mengkelat FEA masih lebih rendah dari asam etilena *diamina tetra asetat* (EDTA) (Gambar 7 dan 8). Aktivitas mengkelat Hb oleh FEA diperkirakan melibatkan interaksi antara senyawa tanin dengan protein globin, seperti pendapat Shahidi dan Nacz (1995). Sedangkan aktivitas kelating terhadap ion Fe^{2+} oleh senyawa antioksidan dalam FEA ditentukan oleh posisi dari gugus fungsional. Ligan bidentat lebih kuat mengkelat ion logam dibandingkan monodentat. Senyawa fenolik glikosida relatif sulit berikatan dengan ion logam (Wong dkk., 2006).

Kemampuan Menghambat Pemucatan Asam Linoleat- β -Karoten

EMB ($IC_{50} = 32,0$ mg/L) mempunyai aktivitas sama dengan AT ($IC_{50} = 30,6$ mg/L), lebih rendah dari BHT ($IC_{50} = 2,5$ mg/L) dan lebih tinggi dari FEA ($IC_{50} = 46,0$ mg/L) (Gambar 9). EMB berpotensi menghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten. Aktivitas antioksidan EMB diperkirakan ada keterlibatan senyawa fenolik dan non fenolik. Hal ini sesuai dengan tingkat kepolaran sistem uji yang melibatkan adanya gugus hidrofilik maupun hidrofobik, seperti dijelaskan oleh Manian dkk. (2008). Dugaan ini dikuatkan oleh Zhu dkk. (2011) bahwa kemampuan menghambat asam linoleat dapat merefleksikan berbagai macam mekanisme antioksidan yang terlibat, seperti kemampuan menangkap radikal bebas, mengikat ion logam, mendekomposisi peroksida dan memutus rantai reaksi dengan melibatkan keseluruhan komponen dalam ekstrak atau fraksi.

KESIMPULAN

Ekstrak metanolik beluntas (EMB) dan fraksi-fraksinya berpotensi sebagai antioksidan pada berbagai sistem uji *in vitro*. Kapasitas antioksidan EMB dan fraksi-fraksinya berbeda-beda untuk setiap sistem uji. EMB mempunyai kadar fenolik total tertinggi menunjukkan aktivitas antioksidan melalui aktivitas menangkap radikal superoksida, mereduksi ion besi dan menghambat pemucatan asam linoleat- β -karoten, sedangkan fraksi etil asetat (FEA) mempunyai aktivitas antioksidan berdasarkan kemampuan menangkap radikal superoksida, mereduksi ion besi, mengkelat ion besi dan hemoglobin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M Dirjen DIKTI atas biaya yang diberikan melalui dana Penelitian Hibah Bersaing 2008.

DAFTAR PUSTAKA

- Andarwulan, N., Batari, R., Sandrasari, D.A., Bollin, B. dan Wijaya, C.H. (2010). Short communication flavonoid content and antioxidant activity of vegetables from Indonesia. *Food Chemistry* **121**:1231–1235.
- (AOAC) Association of Official Analytical Chemist. (1990). *Official methods of analysis of association of official analytical chemists*, 15rd edn. Kenneth Helrich, USA.
- Ardiansyah, Nuraida, L. dan Andarwulan, N. (2003). Aktivitas antimikroba daun beluntas (*Pluchea indica* Less) dan stabilitas aktivitasnya pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* **XIV**(2):90-97.
- Bate-Smith, E.C. (1973). Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemical* **12**:907.
- Biswas, R., Dasgupta, A., Mitra, A., Roy, S.K., Dutta, P.K., Achari, B., Dastidar, S.G. dan Chatterjee, T.K. (2005). Isolation, purification and characterization of four pure compounds from the root extract of *Pluchea indica* Less and the potentiality of the root extract and the pure compounds for antimicrobial activity. *European Bulletin of Drug Research* **13**: 63-70.
- Chan, E.W.C., Lim, Y.Y. dan Omar, M. (2007). Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etingera* species (*Zingiberaceae*) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry* **104**: 1586-1593.
- Dehkharghanian, M., Adenier, H. dan Vijayalakshmi, M.A. (2010). Analytical Methods study of flavonoids in aqueous spinach extract using positive electrospray ionisation tandem quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry* **121**: 863–870.
- Dorman, H.J.D. dan Hiltunen, R. (2004). Fe(III) Reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. *Food Chemistry* **88**: 193–199.
- Harbone, J.B. (1996). *Metode fitokimia*, Padmawinata, K. dan Soediro, I. (penerjemah), Institut Teknologi Bandung, Bandung.
- Houghton, P.J. dan Raman, A. (1998). *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman and Hall, UK.
- Huang, B., He, J., Ban, X., Zeng, H., Yao, X. dan Wang, Y. (2010). Antioxidant activity of bovine and porcine meat treated with extracts from edible lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizome knot and leaf. *Meat Science* **87**(1): 46–53.
- Lai, P., Li, K.Y., Lu, S. dan Chen, H.H.. (2009). Analytical methods phytochemicals and antioxidant properties of solvent extracts from Japonica rice bran. *Food Chemistry* **117**: 538–544.
- Liu, J., Wang, C., Wang, Z., Zhang, C., Lu, S. dan Liu, J. (2011). The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk

- (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. *Food Chemistry* **126**:261–269.
- Ljubuncic, P., Azaizeh, H., Portnaya, I., Cogan, U., Said, O., Saleh, K.U. dan Bomzon, A. (2005). Antioxidant activity and cytotoxicity of eight plants used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* **99**: 43–47.
- Luger, P., Weber, M., Dung, N.X., Ngoc, P.H., Tuong, D.T. dan Rang, D.D. (2000). The crystal structure of hop-17(21)-en-3 β -yl asetat of *Pluchea pteropoda* Hemsl. from Vietnam. *Crystal Res Technology* **35**(3) : 355-362.
- Manian, R., Anusuya, N., Siddhuraju, P. dan Manian, S. (2008). The antioxidant activity and free radical scavenging potential of two different solvent extracts of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntz, *Ficus bengalensis* L. and *Ficus racemosa* L. *Food Chemistry* **107**:1000–1007.
- Mariod, A.A., Ibrahim, R.M., Ismail, M. dan Ismail, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry* **118**:120–127.
- Shahidi, F. dan Naczk, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*, 1st edn. A Technomic Publishing, USA.
- Tapas, A., Sakarkar, D.M. dan Kakde, R.B. (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* **7**(3): 1089-1099.
- Valentão, P., Trindade, P., Gomes, D., Guedes de Pinho, P., Mouga, T. dan Andrade, P.B. (2010). Codium tomentosum and Plocamium cartilagineum: chemistry and antioxidant potential. *Food Chemistry* **119**: 1359–1368.
- Widyawati, P.S. 2004. *Aktivitas Antioksidan Tanaman Herba Kemangi (Ocimum Basicillum Linn) dan Beluntas (Pluchea Indica Less) dalam Sistem Model Asam Linoleat- β -Karoten*. Laporan Penelitian Wima Grant. Unika Widya Mandala Surabaya, Surabaya.
- Wong, S.P., Leong, L.P. dan Koh, J.H.W. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. *Food Chemistry* **99**:775–783.
- Zhu, K.X., Lian, C.X., Guo, X.N., Peng, W. dan Zhou, H.M. (2011). Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry* **126**: 1122-1126