

**PERBANDINGAN DAYA ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN TEMBAKAU
(*Nicotiana tabacum* L) DENGAN RUTIN TERHADAP RADIKAL BEBAS 1,1-DIPHENIL-2-
PIKRILHIDRAZIL (DPPH)**

Rahmani Prastiwati, Wranti Sri Rahayu, Dwi Hartanti

*Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, Jl. Raya Dukuwaluh,
PO Box 202, Purwokerto 53182*

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian untuk membandingkan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun tembakau dengan rutin. Percobaan ini dilakukan dengan membuat ekstrak metanol daun tembakau secara soxhletasi dan mengukur absorbansi DPPH dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada λ 517nm. Data yang diperoleh dianalisis dengan uji t dengan taraf kepercayaan 95%. Hasil penelitian dan analisis menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun tembakau dan rutin memiliki aktivitas antioksidan yang berbeda.

Kata kunci: Antioksidan, 1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil, ekstrak metanol tembakau, rutin.

ABSTRACT

An experiment was done to compare the antioxidant activity of methanolic extract of tobacco leaves and rutin. This experiment was conducted by extracting methanolic extract of tobacco leaves with soxhletation method with methanol and measuring the absorbance of DPPH using spectrofotometry UV- Vis in λ 517 nm. The obtained data was analized by t-test with the confidence level 95%. The result showed that methanolic extract of tobacco leaves extract and rutin have the different of antioxidant activity.

Key word: Antioxidant, 1,1-diphenil-2-pikrilhidrazil, methanolic extract of tobacco leafes, rutin.

Pendahuluan

Asap sebagai sampah buangan pabrik dan kendaraan bermotor bagi warga perkotaan sudah menjadi santapan sehari-hari yang tak terhindarkan. Namun jangan karena

hidup di tengah-tengah polusi udara lalu kita tak menjalani pola hidupsehat. Asalkan setiap orang mau menjaga gaya hidup, terutama pola makan, maka efek zat-zat beracun yang terhirup dari udara dapat diperkecil. Salah satu cara

mudah mengkonsumsi buah, karena mengandung banyak antioksidan yang berguna sebagai penangkal radikal bebas yang dapat dihasilkan dari metabolisme tubuh dan faktor eksternal seperti asap rokok, hasil penyinaran ultraviolet, zat kimiawi dalam makanan, dan polutan (Jayadi, 2009).

Solusi mencegah radikal bebas yang semakin banyak diserap tubuh dan agar daya tahan tubuh semakin optimal adalah dengan mengonsumsi antioksidan, berupa vitamin C, Vitamin E, Zinc, dan Selenium. Jumlah asupan yang dibutuhkan untuk masing-masing orang akan berbeda, disesuaikan dengan jenis aktivitas, kondisi tubuh, gaya hidup, dan faktor-faktor lainnya. Sedangkan antioksidan yang kita makan dari luar melalui makanan atau melalui *food suplemen* untuk membantu tubuh melawan kelebihan radikal bebas, kita sebut antioksidan eksogen (Lovalevi, 2009).

Eksplorasi bahan alami yang mempunyai aktivitas biologis menjadi salah satu target para peneliti, setelah senyawa-senyawa sintetik yang mempunyai aktivitas biologis seperti senyawa antioksidan sintetik (*butylated hydroxytoluen* (BHT), *butylated*

hydroxyanisole (BHA) dan *tertbutylhydroxyquinone* (TBHQ)) dilarang penggunaannya karena dapat memicu kanker. Berbagai studi mengenai BHA dan BHT menunjukkan bahwa komponen ini dapat menimbulkan tumor pada hewan percobaan pada penggunaan dalam jangka panjang (Andarwulan, 1996).

Senyawa antioksidan memiliki peran yang sangat penting dalam kesehatan. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa antioksidan mengurangi resiko terhadap penyakit kronis seperti kanker dan penyakit jantung koroner. Karakter senyawa antioksidan adalah kemampuannya menangkap radikal bebas (Prakash, 2001).

Masyarakat mengenal tembakau hanya digunakan sebagai bahan baku rokok yang dapat mengganggu kesehatan, dan menurut hasil penelitian yang ada didalam tembakau banyak terdapat polifenol yang dominan seperti asam klorogenik dan rutin. Sampai saat ini belum ada data ilmiah yang menunjukkan bahwa tanaman tembakau mempunyai aktivitas antioksidan. Dengan demikian penelitian tentang perbandingan antara aktivitas antioksidan ekstrak metanol

daun tembakau dengan rutin perlu dilakukan.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah : labu takar, beaker glass, Timbangan elektrik (Libror AEG 120), tabung reaksi, pipet volume, Spektrofotometer Uv – Vis (Shimadzu UV-1201).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : serbuk daun tembakau (B2P2TO2T), Metanol p.a (Sigma) , DPPH (Sigma), Rutin (Sigma).

Jalannya Penelitian

Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian adalah benar-benar daun tembakau.

Pembuatan larutan uji

Pembuatan ekstrak metanol daun tembakau dilakukan dengan cara

menimbang 50 g serbuk daun tembakau, dibungkus dengan kertas saring dan kedua ujungnya diikat dengan benang, kemudian dimasukkan dalam alat soxhletasi lalu disoxhletasi dengan pelarut metanol sebanyak 300 mL. Ekstraksi dilakukan sampai bahan yang disari yang terdapat pada tembakau habis, ditandai dengan cairan penyari tidak berwarna kemudian ekstrak dipekatkan dengan *rotavapor* (suhu dijaga tetap 60°C-65°C) sampai pelarut menguap serta didapatkan ekstrak yang kental.

Pembuatan larutan DPPH

Larutan pereaksi adalah larutan DPPH 0,5 mM dalam pelarut metanol yang dibuat dengan menimbang 0,009 g serbuk DPPH kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50,0 mL ditambahkan kedalamnya metanol sampai tanda batas, sehingga didapatkan konsentrasi 0,5 mM yang dihitung terhadap BM DPPH sebesar 394,32 g/mol. Penyiapan larutan DPPH 0,5 mM ini sesuai dengan metode Kwon dan Kim (2003) dengan sedikit modifikasi.

Penentuan *operating time* DPPH

Penentuan *operating time* larutan DPPH 0,5 mM untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun tembakau dilakukan sebagai berikut :

1,0 mL larutan DPPH 0,5 mM ditambah 4,0 mL metanol, dikocok homogen dan diamati serapannya pada menit ke 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60. Kemudian ditentukan waktu *operating timenya*.

Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum larutan DPPH 0,5 mM untuk uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun tembakau dilakukan sebagai berikut: 1,0 mL larutan DPPH 0,5 mM ditambah 4,0 mL metanol, dikocok homogen dan diamati serapannya pada rentang λ 517 nm dengan menggunakan blanko metanol.

Uji aktivitas antioksidan

Ekstrak metanol daun tembakau yang digunakan untuk uji

aktivitas antioksidan dibuat 4 seri konsentrasi yang bervariasi yaitu : 1, 250, 500, dan 1000 $\mu\text{g/mL}$, setelah melakukan orientasi untuk mengetahui konsentrasi yang efektif. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 4,0 mL, kemudian ditambahkan 1,0 mL larutan pereaksi DPPH dalam tabung reaksi, didiamkan pada temperatur kamar selama waktu *operating time*, kemudian diamati absorbansinya pada λ maksimum yang telah ditentukan. Percobaan ini dilakukan 5 kali replikasi dengan blanko metanol.

Analisa Data

Aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH (% peredaman) dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ peredaman DPPH} = \left(\frac{a \text{ DPPH} - a \text{ larutan uji}}{a \text{ DPPH}} \right) \times 100 \%$$

Data aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas DPPH (% peredaman) ekstrak metanol daun tembakau dan rutin dianalisis dan masing-masing replikasi dihitung IC_{50} nya melalui analisis probit, kemudian dianalisis menggunakan uji statistik t test.

Hasil dan Pembahasan

Determinasi Tanaman

Tanaman yang digunakan untuk penelitian telah dideterminasi di B2P2TO2T Tawangmangu. Rujukan determinasi digunakan buku *Flora of Java* Backer and Van den Brink(1965). Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang

digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman tembakau atau (*Nicotiana tabacum*.L).

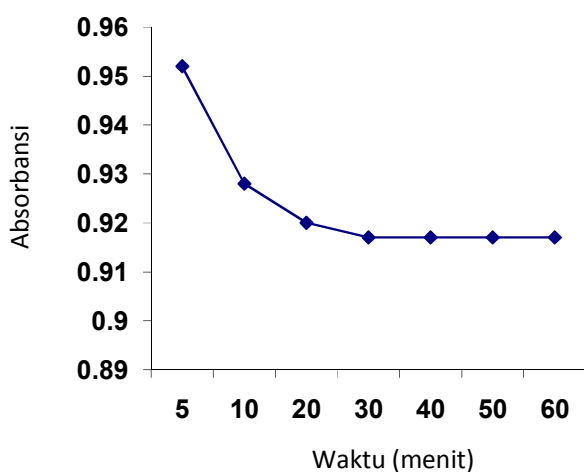
Pembuatan Ekstrak Tembakau

Pembuatan ekstrak daun tembakau menggunakan metode soxhletasi dengan larutan penyari metanol. Keuntungan metode soxhletasi adalah cairan penyari yang diperlukan lebih sedikit dan secara langsung diperoleh hasil yang lebih pekat. Serbuk simplisia disari oleh cairan penyari murni, sehingga dapat menyari zat aktif atau senyawa lebih banyak. Penyarian dapat diteruskan sesuai dengan keperluan, tanpa menambah volume cairan penyari. Kerugian dari cara ini adalah zat aktif

atau senyawa yang tidak tahan pemanasan kurang cocok dan cairan penyari yang digunakan harus murni. Diperoleh ekstrak kental 13,9738 gram dengan rendemen 27,95 %.

Penetapan *Operating Time*

Operating Time adalah waktu yang tepat untuk pembacaan serapan larutan yang diperiksa pada saat serapannya stabil pada kurva *operating time*. Sampel yang digunakan adalah yang berwarna sehingga dapat diketahui pada menit beberapa terjadi kestabilan. Dari hasil percobaan penetapan *operating time* menggunakan DPPH menunjukkan bahwa serapan stabil mulai menit ke 30.

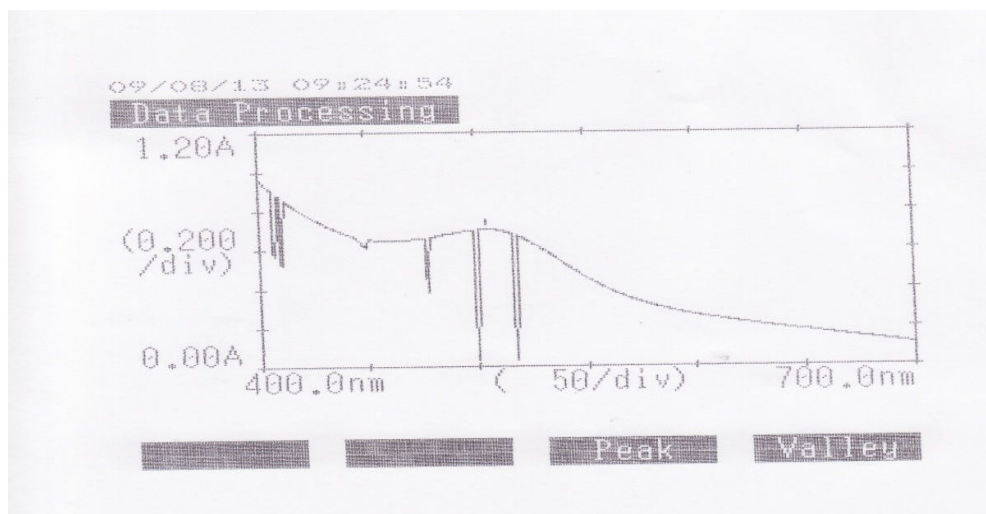


Gambar 1. penentuan *operating time* larutan DPPH

Penetapan Panjang Gelombang Maksimal DPPH

Penetapan panjang gelombang maksimal bertujuan untuk mengetahui besarnya panjang gelombang yang

dibutuhkan larutan DPPH untuk mencapai serapan maksimal. Hasil penetapan panjang gelombang maksimal larutan DPPH adalah 517 nm.



Gambar 2. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH

Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Potensi antioksidan penangkap radikal ditentukan dengan menggunakan DPPH, suatu radikal sintetik yang stabil dalam larutan air atau metanol dan mampu menerima sebuah elektron atau radikal hidrogen untuk menjadi molekul diamagnetik yang stabil. DPPH pada uji ini ditangkap oleh antioksidan yang melepaskan hidrogen, sehingga membentuk DPPH tereduksi (DPP-Hidrazin). Perubahan warna violet DPPH menjadi kuning

diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang maksimum (517 nm), ini menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang dapat dilihat dari % peredaman (Sunarni, 2005).

Pada tumbuhan ada beberapa senyawa fenolat yang merupakan antioksidan kuat, yaitu flavonoid, tanin, dan lignin yang berfungsi sebagai prekursor menangkap (*scavenger*) senyawa radikal oksigen (ROS). Tanin memiliki antioksidan yang berfungsi sebagai pengikat unsur logam

berbahaya dalam tubuh. Melancarkan proses pencernaan sekaligus menetralsisir lemak dalam makanan.

Polifenol yang berperan besar dalam pencegahan berbagai penyakit.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak metanol

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Antioksidan (%)				
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Replikasi IV	Replikasi V
1	3,02	1,71	1,10	2,42	1,41
250	69,79	74,29	75,10	69,05	71,07
500	89,72	87,80	88,31	89,11	89,82
1000	91,73	90,22	91,33	92,64	92,04

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antioksidan rutin

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Aktivitas Antioksidan (%)				
	Replikasi I	Replikasi II	Replikasi III	Replikasi IV	Replikasi V
1	35,08	29,74	31,25	33,97	38,10
250	91,22	91,03	92,24	91,43	91,33
500	96,27	94,76	96,57	95,56	96,07
1000	98,18	97,68	99,09	98,59	98,08

Polifenol ini seratus kali lebih efektif dari vitamin C dan 25 kali lebih efektif dari vitamin E. Zat ini juga berfungsi untuk menetralsisir radikal bebas. Sehingga memungkinkan mencegah serangan jantung dan kanker juga menormalkan hyperfuntion serta kelenjar godok. Hasil dari uji aktivitas antioksidan ekstrak tembakau dan rutin dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2.

Aktivitas antioksidan merupakan kemampuan suatu senyawa atau ekstrak untuk menghambat reaksi oksidasi yang dapat dinyatakan dengan persen peredaman atau

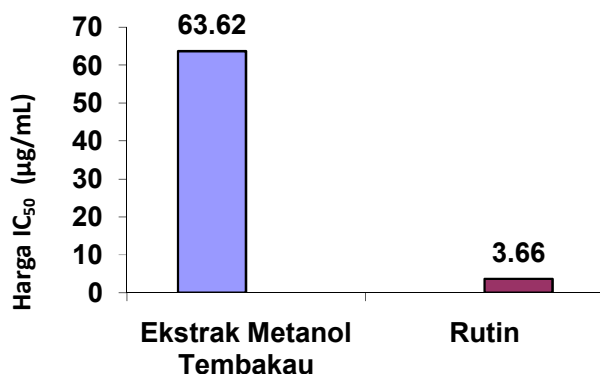
penghambatan. Parameter yang dipakai untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah harga konsentrasi efisien atau *efficient concentration* (EC_{50}) atau *inhibition concentration* (IC_{50}) yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan % penghambatan 50%. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi, akan mempunyai harga EC_{50} atau IC_{50} yang rendah (Andarwulan, 1996).

Pengamatan aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak metanol daun tembakau dan dibandingkan dengan rutin sebagai kontrol positif. Ekstrak metanol daun

tembakau menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antioksidannya. Nilai IC₅₀ masing-masing zat uji terlihat pada tabel 6.

Tabel 6. Nilai IC₅₀ dari masing-masing zat uji.

Replikasi	Harga IC ₅₀ (µg/mL)	
	Ekstrak metanol	Rutin
1	52,89	3,35
2	62,45	4,56
3	71,22	4,12
4	61,55	3,53
5	69,98	2,77
IC ₅₀ rata-rata ± SD	63,62 ± 7,399	3,66 ± 0,695



Gambar 7. Aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH ekstrak metanol daun tembakau dan rutin

Hasil penelitian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH terlihat pada Gambar 7, menunjukkan bahwa rutin mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi dengan IC₅₀ 3,66

µg/mL dibanding ekstrak metanol daun tembakau dengan IC₅₀ 63,62 µg/mL.

Untuk uji t digunakan hipotesis nol (H₀), yaitu tidak ada perbedaan bermakna antara IC₅₀ ekstrak metanol dengan rutin. Hipotesis a (H_a, yaitu ada

perbedaan bermakna antara IC_{50} ekstrak metanol dengan rutin. Bila t hitung berada didaerah penerimaan H_0 (diantara t tabel), maka hipotesis nol diterima dan hipotesis a ditolak, ini berarti tidak ada perbedaan bermakna. Bila t hitung berada di daerah penolakan H_0 (diluar t tabel), maka hipotesis nol ditolak dan hipotesis a diterima, ini berarti ada perbedaan yang bermakna.

Data yang diperoleh diolah menggunakan SPSS dengan analisa statistik uji t . Analisis data menggunakan taraf kepercayaan 95% atau signifikansi 0,05 artinya penelitian yang dilakukan 95% keputusannya benar dan dapat melakukan kesalahan dengan probabilitas 0,05. Uji t memberikan nilai t -hitung sebesar 18,046 dan nilai t -tabel sebesar 2,306. Jadi t -hitung lebih besar dari t -tabel dan H_0 ditolak atau ada perbedaan signifikan antara harga IC_{50} ekstrak metanol daun tembakau dan rutin.

Secara keseluruhan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun tembakau masih dibawah aktivitas antioksidan rutin, akan tetapi ekstrak metanol daun tembakau memiliki aktivitas antioksidan yang kuat terhadap radikal DPPH karena IC_{50} nya

<100. Dengan pertimbangan tersebut maka, ekstrak metanol daun tembakau potensial untuk dikembangkan sebagai antioksidan alami.

Kesimpulan

Ekstrak metanol daun tembakau mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat terhadap radikal bebas DPPH dengan harga IC_{50} 63,62 $\mu\text{g/mL}$. Ekstrak metanol daun tembakau (IC_{50} 63,62 $\mu\text{g/mL}$) mempunyai aktivitas antioksidan yang berbeda dari rutin (IC_{50} 3,66 $\mu\text{g/mL}$)

Daftar Pustaka

- Andarwulan, N., H. Wijaya, dan D.T. Cahyono, 1996, *Aktivitas Antioksidan dari Daun Sirih (Piper betle L)*, Teknologi dan Industri Pangan, VII, 1, 29-30
- Jayadi, 2009, *Buah, Penangkal Polusi Udara*, <http://www.jurnalbogor.com/?p=26651>. Diakses, 1 Agustus 2009.
- Kwon, Y.S., and Kim, C.M., 2003, *Antioxidant Constituents from the Stem of Sorghum bicolor*, Arch. Pharm. Res., Vol 26 (7), 535-539.

Lovalevi, 2009, *Hati-hati dengan Radikal Bebas di ruang kerja anda*,
<http://lovalevi.blogspot.com/2009/02/hati-hati-dengan-radikal-bebas-di-ruang.html>.
Diakses 1 Agustus 2009.

Prakash A, 2001. *Antioxidant Activity, Medallion Laboratoris*

Analytical Proges,
19(2).Sunarni, T., 2005,
Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel (Stelechocarpus burahol), Jurnal Farmasi Indonesia, Vol 2 (1), 15.