

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK DAUN KAYU BULAN (*Pisonia alba*)

Heryanto Matheos¹⁾, Max Revolta John Runtuwene²⁾, dan Sri Sudewi¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

²⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) is a plant native to Indonesian, generally this plant is only used as an ornamental plant are unwittingly have a high enough potential in curing various diseases. The potential can be partially attributed to the antioxidant activity of existing plants. The purpose of this study was to test the antioxidant activity of the leaf extract of kayu bulan (*Pisonia alba* Span.). The method of extraction in this study using maceration with ethanol 40, 60 and 80%. The extract obtained is determined phenolic content and antioxidant activity assay with DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Based on the results obtained in leaf of kayu bulan has a total phenolic content of 12.45, 16.22, 28.67 (mg / kg) to extract 40, 60 and 80 %, respectively. Based on the results of the calculation of IC₅₀ showed that extract had IC₅₀ values are 544.44, 478.12 and 236.50 ppm for 40, 60 and 80 %, respectively

Key words : leaf of kayu bulan, test phytochemicals, antioxidants, DPPH.

ABSTRAK

Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) merupakan tanaman asli Indonesia. Umumnya tanaman ini hanya digunakan sebagai tanaman hias saja yang tanpa disadari memiliki potensi yang cukup tinggi dalam menyembuhkan berbagai macam penyakit. Potensi tersebut diduga karena aktivitas antioksidan yang ada pada tumbuhan tersebut. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kayu bulan (*Pisonia alba* Span.). Metode ekstraksi dalam penelitian ini menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 40, 60 dan 80 %. Ekstrak yang diperoleh ditentukan kandungan fenolik dan diuji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Berdasarkan hasil yang didapat daun kayu bulan memiliki kandungan total fenolik 12.45, 16.22, 28.67 (mg/kg) untuk ekstrak 40, 60 dan 80 %. Berdasarkan hasil perhitungan IC₅₀ menunjukan bahwa ekstrak memiliki nilai IC₅₀ berturut-turut yaitu 544.44, 478.12, dan 236.50 ppm.

Kata kunci : daun kayu bulan, uji fitokimia, antioksidan, DPPH.

PENDAHULUAN

Beberapa penyakit kronis yang lazim dijumpai dan diderita masyarakat Indonesia diantaranya kanker, jantung, artritis, diabetes, liver, inflamasi dan penyakit-penyakit degeneratif. Ada berbagai macam teori yang dapat menjelaskan penyebab penyakit degeneratif. Salah satu teori yang dianggap cukup signifikan adalah teori reaksi radikal bebas. Berdasarkan teori ini, penyebab penyakit degeneratif ialah akibat timbulnya radikal bebas (hidroksil) dalam mekanisme biokimia yang terjadi di dalam tubuh (Oeinitan, 2013).

Radikal bebas (*free radical*) adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Radikal bebas dianggap berbahaya karena menjadi sangat reaktif dalam upaya mendapatkan pasangan elektronnya, dapat pula terbentuk radikal bebas baru dari atom atau molekul yang elektronnya didonor untuk berpasangan dengan radikal bebas sebelumnya. Sifat yang sangat reaktif dan aktivitas yang tidak beraturan oleh radikal bebas, dapat menimbulkan kerusakan pada bagian-bagian sel dalam tubuh (Muhilal, 1991; Auroma, 1994).

Proses oksidasi radikal bebas dapat dihambat atau dinetralkan dan dihancurkan oleh senyawa yang tergolong antioksidan. Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat digunakan untuk melindungi komponen biologi seperti lipida, protein, vitamin dan DNA melalui perlambatan kerusakan, ketengikan atau perubahan warna yang disebabkan oleh oksidasi (Suryanto, 2012). Sumber-sumber antioksidan dapat berupa antioksidan sintetik maupun antioksidan alami (Gordon, 1994). Saat ini penggunaan antioksidan sintetik mulai dibatasi karena dari hasil penelitian yang telah dilakukan, antioksidan sintetik seperti BHT (*Butylated Hydroxy Toluena*) dapat meracuni dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, industri makanan dan obat-obatan beralih pada pengembangan dan pencarian sumber-sumber antioksidan

alami yang baru (Takashi dan Takayuni, 1997).

Kayu bulan merupakan salah satu tanaman yang terdapat dibagian timur Indonesia dan diduga mengandung senyawa antioksidan. Secara empiris, rebusan daun Kayu bulan atau (*Pisonia alba* Span.) sering digunakan sebagai bahan herbal dalam penyembuhan penyakit seperti, bisul, bengkak, penebalan kulit, mata ikan, dan poliuria. Salah satu kandungan kimia yang terdapat pada Kayu bulan yaitu fenolik (Hembing, 1994). Senyawa fenolik mempunyai struktur dan sifat yang khas, yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada satu atau lebih cincin aromatik benzena, sehingga senyawa ini dapat teroksidasi. Kemampuannya membentuk radikal fenoksi yang stabil pada proses oksidasi, menyebabkan senyawa ini banyak digunakan sebagai antioksidan (Suryanto, 2012).

Pada penelitian ini, ekstrak yang diperoleh menggunakan cara maserasi dengan konsentrasi etanol 40, 60 dan 80% bertujuan untuk mengetahui penarikan kandungan terbaik dari daun Kayu Bulan. Penggunaan varian konsentrasi pelarut dilakukan karena semakin tinggi konsentrasi etanol maka semakin rendah tingkat kepolaran pelarut yang digunakan (Shadmani, dkk, 2004). Oleh sebab itu, rendemen yang dihasilkan merupakan jumlah senyawa yang terekstrak oleh berbagai macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Syahbirini dkk, 2005). Pengujian kandungan fitokimia, fenolik dan antioksidan dengan metode DPPH dilakukan untuk menentukan kualitas ekstrak. Setelah itu potensi dan aktivitas ekstrak sebagai antioksidan dibandingkan dengan vitamin c.

Tujuan penelitian yaitu mengetahui kandungan metabolit sekunder pada ekstrak etanol daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.) pada konsentrasi 40, 60 dan 80%, mengetahui kandungan total fenolik ekstrak etanol daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.) dan mengetahui aktivitas

antioksidan ekstrak etanol daun Kayu Bulan (*Pisonia alba* Span.)

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: daun Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.), etanol 40, 60, dan 80%, larutan natrium karbonat, reagen *Folin-Ciocalteu*, 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), asam askorbat, besi (III) klorida, asam sulfat 2 M, reagen *Mayer*, asam klorida pekat, serbuk magnesium dan aquades.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: pisau, alat-alat gelas (*pyrex*), botol kaca transparan, mikro pipet, blender, spatula, vortex, saringan, oven (*memmerf*), rotari evaporator (*eyla N-1000*), spektrofotometer (*Shimadzu 1800*), timbangan (*A&D company limited*).

Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari daerah Kepulauan Sangihe Kecamatan Tahuna Timur. Bahan yang digunakan adalah bagian daun yang berwarna kuning cerah.

Identifikasi Tanaman

Identifikasi tanaman dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi Manado.

Preparasi Sampel

Daun Kayu bulan di cuci pada air mengalir kemudian di rajang menjadi bagian yang lebih kecil, lalu dikeringkan. Setelah kering daun Kayu bulan dihaluskan dengan blender.

Ekstraksi

Ekstraksi daun Kayu bulan menggunakan pelarut etanol 40, 60 dan 80%. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi selama 5 hari. Ditimbang sebanyak 100 gram daun Kayu bulan lalu ditambahkan pelarut 500 mL dengan perbandingan (1:5) hingga daun Kayu bulan terendam seluruhnya. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari terlindung dari cahaya dan dilakukan

pengadukan 1x24 jam. Pada hari ke 3 larutan disaring untuk dilakukan remaserasi sehingga menghasilkan filtrat untuk tiap remaserasi. Filtrat yang didapat pada tiap pergantian pelarut digabungkan kemudian masing-masing hasil ekstrak diuapkan menggunakan rotari evaporator hingga diperoleh ekstrak dari Kayu bulan.

Penentuan Kandungan Fitokimia (Harborne, 1987).

Uji Alkaloid

Sebanyak 4 mL ekstrak daun Kayu bulan dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 2 mL kloroform dan 2,5 mL amonia 10 %, lalu ditambahkan 10 tetes asam sulfat 2 M untuk memperjelas pemisahan terbentuknya 2 fase yang berbeda. Bagian atas dari fase yang terbentuk diambil, kemudian ditambahkan reagen *Mayer*. Keberadaan alkaloid dalam sampel ditandai dengan terbentuknya endapan merah.

Uji Flavonoid

Ekstrak daun Kayu bulan sebanyak 1 mL diambil dan ditambahkan serbuk magnesium secukupnya dan 10 tetes asam klorida pekat. Keberadaan flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna hitam kemerahan pada larutan.

Uji Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak daun Kayu bulan ditambahkan dengan 10 mL air panas, kemudian ditetesi menggunakan besi (III) klorida. Keberadaan tanin dalam sampel di tandai dengan timbulnya warna hijau kehitaman.

Uji Saponin

Sebanyak 1 mL ekstrak daun Kayu bulan ditambahkan dengan 10 mL aquades kemudian dikocok kuat selama kurang lebih 1 menit. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan diamati buih atau busa yang terbentuk. Keberadaan senyawa saponin dalam sampel ditandai dengan

terbentuknya buih yang stabil selama 10 menit dengan tinggi 3 cm.

Uji Steroid

Sebanyak 1 mL ekstrak daun Kayu bulan diambil dan ditambahkan dengan 2 mL kloroform. Setelah itu campuran dikocok. Kemudian filtrat ditambahkan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat masing-masing sebanyak 2 tetes. Reaksi positif ditunjukkan pada perubahan warna merah pada larutan pertama kali kemudian berubah menjadi biru dan hijau.

Penentuan Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik ekstrak daun Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) ditentukan menggunakan metode *Folin Ciocalteu* (Conde, dkk, 1997). Sebanyak 0,1 mL larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,1 mL reagen *Folin Ciocalteu* 50%. Campuran tersebut divortex, lalu ditambahkan 2 mL larutan natrium karbonat 2%. Selanjutnya, campuran diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit. Pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 750 nm menggunakan spektrofotometer. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai mg ekivalen asam galat/kg ekstrak.

Penentuan Aktivitas Penangkap Radikal Bebas Dengan DPPH

Penentuan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH menurut Burda dan Olezek (2001). Sebanyak 1 mL masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 50, 150, 200, 250, 500 dan 550 ppm ditambahkan dengan 1 mL larutan *1,1 difenil-2-pikrilhidrazil* (DPPH) dalam etanol dan divortex selama 2 menit. Berubahnya warna larutan dari ungu menjadi kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Selanjutnya pada 5 menit terakhir menjelang 30 menit inkubasi, absorbansi diukur pada panjang gelombang 520 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian diamati

perbandingannya dengan vitamin C sebagai standar.

Aktivitas penangkapan radikal bebas dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Aktivitas penangkal radikal bebas (\%)} = 1 - \frac{\text{Absorbansi sampel}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Penentuan Nilai IC₅₀

Nilai IC₅₀ dihitung dari interpolasi pada grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji dan daya antioksidan pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, kemudian dibandingkan dengan nilai IC₅₀ larutan standar vitamin C yang dihitung dari interpolasi pada grafik hubungan antara konsentrasi vitamin C dan daya antioksidan. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi penghambatan 50% terhadap radikal bebas DPPH dari senyawa ekstrak daun Kayu bulan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Sampel

Identifikasi sampel daun Kayu bulan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi Manado. Tujuan dilakukan identifikasi sampel adalah untuk membuktikan kebenaran sampel yang digunakan dalam penelitian ini benar merupakan tumbuhan daun Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.).

Preparasi Sampel

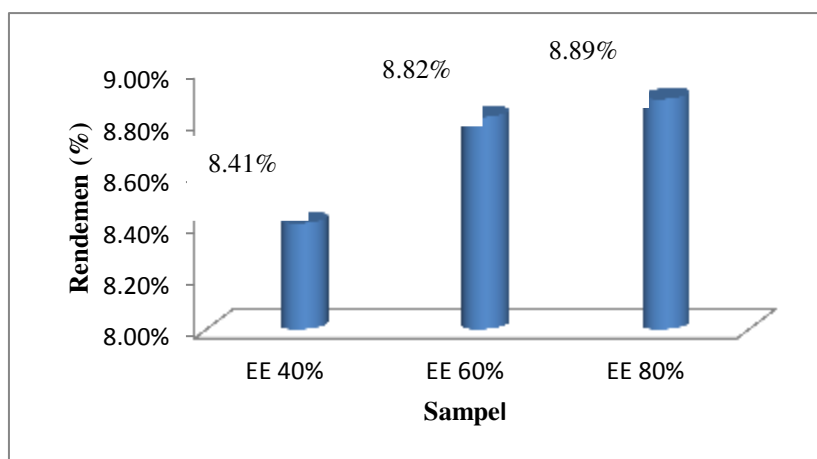
Sampel yang akan digunakan dibersihkan dengan menggunakan air mengalir lalu dirajang hingga kecil kemudian sampel dikering anginkan. Sampel kering tersebut dihaluskan dengan menggunakan blender. Setelah itu serbuk yang didapat diayak, tujuannya agar ukuran partikel bersifat homogen, dimana homogenitas partikel ini merupakan parameter utama yang akan mempengaruhi

keseragaman tahapan ekstraksi bahan aktif, yang tergantung pada kecepatan difusi zat aktif serbuk (simplisia) menuju pelarut, waktu kontak dan kecepatan pelarut melewati bahan serbuk tanaman obat (Saifuddin, dkk, 2011)

Ekstraksi Daun Kayu Bulan

Tujuan utama penggunaan metode maserasi disebabkan karena sifat antioksidan yang tidak tahan panas dan fungsinya untuk menyari senyawa metabolit sekunder. Akibat adanya perendaman, pelarut akan mempunyai

waktu interaksi yang lebih lama dengan sampel, sehingga memungkinkan terjadinya proses pemecahan dinding dan membran sel sampel. Hal ini terjadi karena perbedaan tekanan antara bagian dalam sel dan luar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada didalam sitoplasma akan keluar dan terlarut dalam pelarut organik. Pada proses ini digunakan media kaca karena kaca merupakan media yang tahan terhadap reaksi kimia sehingga tidak membuat ekstrak mudah terkontaminasi (Tobo F, dkk, 2001).



Gambar 5. Rendemen hasil ekstraksi

Hasil rendemen yang didapatkan dari ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol dapat dilihat pada gambar 5 dan lampiran 1. Rendemen yang dihasilkan dari pelarut etanol dengan konsentrasi 80% lebih banyak, dibandingkan dengan pelarut etanol 40%. Rendemen pada konsentrasi etanol 60 % tidak berbeda jauh dengan etanol 80%, sehingga warna yang dihasilkan yaitu hijau pekat untuk ekstrak 80% dan hijau agak kekuningan untuk ekstrak 60%. Etanol 80% diduga dapat melarutkan senyawa fitokimia secara maksimal dan mampu menarik beberapa senyawa fitokimia seperti alkaloid, flavonoid, glikosida flavonoid serta klorofil yang terlarut dalam pelarut polar.

Senyawa-senyawa yang diekstrak oleh pelarut etanol 80% cukup banyak dan

menghasilkan rendemen yang tinggi. Hal ini didukung oleh ekstrak yang berwarna hijau pekat dan bau rendemen yang tajam sehingga diduga bahwa minyak atsiri juga ikut terlarut (Melodita, 2011).

Berbeda dengan rendemen dari ekstrak etanol 40% dan 60% yang cenderung lebih berwarna kuning dari pada hijau dan terjadi penurunan rendemen yang cukup banyak. Rendemen yang dihasilkan merupakan jumlah senyawa yang terekstrak oleh berbagai macam pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda (Syahbirini, dkk, 2005).

Skrining Fitokimia

Hasil uji skrining fitokimia ekstrak daun Kayu bulan dengan konsentrasi 40,

60 dan 80 % menunjukkan bahwa terdapat senyawa bioaktif yaitu, alkaloid, flavonoid, tanin, dan saponin (lihat tabel 1).

Tabel 1. Uji fitokimia Ekstrak Etanol Daun Kayu Bulan

UJI FITOKIMIA	40%	60%	80%	INDIKATOR
Alkaloid	-	+	+++	Terbentuk endapan merah
Flavonoid	++	++	+++	Perubahan warna menjadi hitam kemerahan
Tanin	++	++	++	Perubahan warna hitam kehijauan/kuning
Steroid/Terpenoid	-	-	-	Tidak terjadi perubahan warna
Saponin	+	++	+++	Terbentuk busa yang stabil

Keterangan :
 (++++) = Kuat
 (++) = Sedang
 (+) = Lemah
 (-) = Tidak mengandung senyawa yang dimaksud

Alkaloid

Pada pengujian alkaloid, yang positif mengandung alkaloid hanya pada konsentrasi ekstrak 60% dan 80%. Prinsip dari metode analisis ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam pereaksi *Wagner*. Pereaksi *Wagner* mengandung kalium iodida dan merkuri klorida kalium tetraiodomerkurat (II). Namun menurut Sastroamidjojo (1996), metode ini memiliki kelemahan yaitu pereaksi- pereaksi tersebut bukan hanya mengendapkan alkaloid tetapi juga dapat mengendapkan beberapa jenis senyawa lain seperti, protein, kumarin, α -piron, hidroksi flavon, dan tanin.

Hasil negatif pada ekstrak etanol 40% disebabkan karena kandungan ekstrak yang lebih banyak mengandung pelarut air dari pada etanol. Salah satu sifat dari alkaloid yaitu tidak larut dalam air (Fengel dan Wegener, 1984).

Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil. Oleh karena itu, umumnya

flavonoid larut dalam pelarut polar seperti etanol. Etanol berfungsi sebagai pembebas flavonoid dari bentuk garamnya. Penambahan asam sulfat 2 N berfungsi untuk protonasi flavonoid hingga terbentuk garam flavonoid. Setelah penambahan bubuk magnesium, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi hitam kemerahan. Warna hitam kemerahan yang dihasilkan menandakan adanya flavonoid akibat dari reduksi oleh asam klorida pekat dan magnesium (Harborne, 1987).

Saponin

Pada hasil uji saponin, masing-masing sampel menunjukkan hasil yang positif yakni memiliki busa yang stabil selama 10 menit. Saponin merupakan bentuk glikosida dari sapogenin sehingga akan bersifat polar. Saponin adalah senyawa yang bersifat aktif permukaan dan dapat menimbulkan busa jika dikocok dalam air (Kristanti dkk, 2008). Timbulnya busa pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya (Marliana dkk, 2005).

Steroid

Pada pengujian ini hasil yang diperoleh negatif karena tidak adanya reaksi yang terjadi. Pada pengujian steroid dan triterpenoid, analisis senyawa didasarkan pada kemampuan senyawa tersebut membentuk warna dengan H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (Ciulei, 1984).

Tanin

Tanin dibagi menjadi dua golongan dan masing-masing golongan memberikan reaksi warna yang berbeda terhadap $FeCl_3$ 1%. Golongan tannin terhidrolisis akan menghasilkan warna biru kehitaman dan tannin kondensasi akan menghasilkan warna hijau kehitaman. Pada saat penambahannya, diperkirakan $FeCl_3$ bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tannin. Hasil reaksi itulah yang akhirnya menimbulkan warna. Pereaksi $FeCl_3$ digunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol termasuk tannin. Oleh sebab itu, diduga bahwa hasil positif juga dapat disebabkan oleh adanya senyawa fenolik lain dalam sampel (Harborne, 1987).

Penentuan Kandungan Total Fenolik

Berdasarkan uji fitokimia kandungan ekstrak daun Kayu bulan, maka dapat diketahui kandungan yang terdapat dalam ekstrak dengan konsentrasi etanol 40, 60 dan 80% yaitu flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin. Flavonoid dalam ekstrak daun Kayu bulan diduga berupa aglikon maupun glikosida. Aglikon umumnya mempunyai daya antioksidan dan penangkap radikal lebih tinggi daripada glikosida flavonoid. Hal ini disebabkan karena pada glikosida flavonoid gugus hidroksi fenolik yang merupakan gugus aktif antioksidan maupun penangkap radikal telah mengikat gugus gula flavonoid dan derivat polifenol yang merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan. Senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yakni senyawa dengan suatu gugus $-OH$ yang

terikat pada karbon cincin aromatik. Produk radikal bebas senyawa-senyawa ini stabil secara resonansi dan tidak reaktif jika dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain, sehingga dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif (Fessenden dan Fessenden, 1994)

Berdasarkan hasil pengukuran, kadar total fenol dapat dilihat pada gambar 7 dan lampiran 2. Pengujian aktivitas total fenol merupakan dasar dilakukannya pengujian aktivitas antioksidan, karena diketahui bahwa senyawa fenolik berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Pengukuran total antioksidan bahan pangan asal tanaman dapat dilakukan dengan mengukur kadar total fenolik menggunakan reagen *Folin-ciocalteau*. Hal ini disebabkan karena sebagian besar antioksidan dalam bahan asal tanaman merupakan senyawa polifenol.

Menurut Shahidi dan Marian (1995) pengujian total fenol bertujuan untuk menentukan total senyawa fenolik yang terkandung di dalam sampel, sehingga diduga bila kandungan senyawa fenolik di dalam sampel tinggi maka aktivitas antioksidannya akan tinggi. Dari hasil ekstrak etanol konsentrasi 1000 ppm pengukuran yang didapat menunjukkan adanya peningkatan yang cukup signifikan.

Diduga dengan adanya peningkatan total fenol maka terdapat aktivitas antioksidan yang berlangsung. Kandungan total fenol dapat dihasilkan dari sejumlah molekul sederhana yaitu senyawa fenolik, sampai dengan molekul yang kompleks (Stevi G. dkk, 2012). Hal ini menunjukkan adanya senyawa-senyawa fenolik pada ekstrak daun Kayu bulan. Akan tetapi kandungan total fenol tidak berkorelasi positif dengan aktivitas antioksidan yang terdapat dalam ekstrak daun Kayu bulan. Tidak semua senyawa fenol yang diekstrak dalam pelarut etanol merupakan senyawa fenol yang dapat berfungsi sebagai antioksidan (Fessenden dan Fessenden, 1994).

Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun Kayu bulan ini menggunakan radikal bebas *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* (DPPH). Pengukuran antioksidan dengan metode DPPH merupakan metode pengukuran antioksidan yang sederhana, cepat dan tidak membutuhkan banyak reagen seperti halnya metode lain. Hasil pengukuran dengan metode DPPH menunjukkan kemampuan antioksidan sampel secara umum, tidak berdasarkan jenis radikal yang dihambat (Juniarti, dkk., 2009).

Konsentrasi ekstrak sampel daun Kayu bulan yang digunakan adalah 50, 100, 150, 200, 250, 500 dan 550 ppm. Masing-masing konsentrasi dipipet 1 mL

dan dicampurkan dengan 1 mL larutan DPPH 100 μ M. Campuran tersebut diinkubasi selama 30 menit pada tempat gelap, kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer *UV-Vis* pada panjang gelombang maksimum (520 nm). Pada tiap konsentrasi dilakukan 2 kali pengulangan, vitamin C (asam askorbat) digunakan sebagai pembanding dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, 12 dan 14 ppm.

Nilai konsentrasi penghambatan aktivitas radikal bebas sebanyak 50% (IC_{50}) dihitung dengan menggunakan persamaan regresi yang diperoleh dari hubungan antara konsentrasi sampel dan persentase penghambatan aktivitas radikal bebas.

Tabel 2. Perbandingan IC_{50} ekstrak etanol 40%, 60%, 80% dan Vitamin C.

Ekstrak	Persamaan Grafik	Nilai IC_{50}
Ekstrak Etanol 80%	$y = 0.1493x + 14.691$ $R^2 = 0.9945$	236.497
Ekstrak Etanol 60%	$y = 0.0812x + 11.177$ $R^2 = 0.9834$	478.116
Ekstrak Etanol 40%	$y = 0.0775x + 7.8057$ $R^2 = 0.9704$	544.443
Vitamin C	$y = 4.1534x - 3.6429$ $R^2 = 0.9799$	11.161

Prinsip metode penangkapan radikal ialah pengukuran penangkapan radikal bebas dalam pelarut organik polar seperti etanol atau metanol pada suhu kamar oleh suatu senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan (Pokorny, 2001). Proses penangkapan radikal ini melalui mekanisme pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan oleh radikal bebas (Pire, Stanley, 1988) sehingga radikal bebas menangkap satu elektron dari antioksidan. Senyawa DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan melalui pengambilan atom hidrogen dari senyawa antioksidan untuk mendapatkan pasangan elektron (Pokorny, 2001).

Panjang gelombang serapan maksimum (λ maks) DPPH yang didapatkan dalam penelitian ini adalah 520 nm. Dengan digunakan *operating time* selama 30 menit. Sempurnanya campuran DPPH dan ekstrak dibantu dengan perlakuan *Ultra sonic* selama 2 menit tiap sampel. Senyawa yang bereaksi sebagai penangkap radikal akan mereduksi DPPH yang dapat diamati dengan adanya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning. Ketika elektron ganjil dari radikal DPPH telah berpasangan dengan hidrogen dari senyawa penangkap radikal bebas maka akan membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004).

Oleh karena terjadinya reaksi fenol dan DPPH (Gambar 9), maka radikal bebas DPPH akan membentuk senyawa bukan radikal yaitu DPPH idrazin yang stabil (Windono, 2001). Perhitungan yang digunakan dalam penentuan aktivitas penangkap radikal adalah nilai IC_{50} . Nilai tersebut menggambarkan besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat menangkap radikal sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dengan menggunakan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel (senyawa uji) dengan aktivitas penangkap radikal rata-rata. Semakin kecil nilai IC_{50} maka senyawa uji tersebut akan semakin efektif sebagai penangkap radikal. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etanol memiliki nilai IC_{50} 544.51 g/mL, 477.99 g/mL, 236.50 g/mL untuk konsentrasi 40, 60 dan 80%.

Hasil ini sejalan dengan kandungan total fenol yang menunjukkan ekstraksi 80% memiliki kandungan yang lebih tinggi daripada ekstrak lain. Ekstrak menunjukkan kadar fenol yang tinggi namun aktivitas antioksidannya rendah. Diduga fraksi ini banyak mengandung klorofil atau lignin karena tidak semua senyawa fenol yang diekstrak dalam pelarut alkohol merupakan senyawa fenol yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Contohnya saja lignin yang berfungsi sebagai bahan pembentuk dinding sel tanaman juga merupakan senyawa golongan fenol yang fungsinya sebagai antioksidan belum diketahui (Maulida. R. 2007).

Perubahan warna ungu menjadi kuning pada uji aktivitas antioksidan menandakan terbentuknya radikal antioksidan. Semakin banyak atom H dari antioksidan yang didonorkan pada DPPH maka semakin banyak radikal antioksidan yang terbentuk (Suryanto, 2012)

Vitamin C sebagai senyawa pembanding memiliki nilai IC_{50} 11.161 g/mL (Tabel 2). Nilai IC_{50} vitamin C lebih kecil dibanding dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol 80% daun Kayu bulan karena

merupakan senyawa yang murni dibandingkan dengan ekstrak dengan konsentrasi 40% dan 60%. Molekul vitamin C mempunyai 2 tempat abstraksi hidrogen yang terhubung secara internal, sehingga ada abstraksi lanjutan setelah abstraksi pertama. Jika dibandingkan dengan IC_{50} vitamin C, maka senyawa ekstraksi cukup berpotensi sebagai antioksidan. Vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi karena vitamin C memiliki 2 gugus hidroksil yang mengakibatkan lebih mudah dalam pendonoran hidrogen. Menurut Sudarmadji (1996), vitamin C sebagai antioksidan dapat memberikan satu atau dua elektronnya untuk menstabilkan radikal bebas.

PENUTUP

Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan :

- Daun Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) memiliki aktivitas antioksidan yang kecil tapi cukup baik dalam menangkap radikal bebas pada metode DPPH. Ekstrak etanol 80% menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling baik dengan nilai aktivitas IC_{50} 236.50 g/mL, sedangkan etanol 60% bernilai 477.99 g/mL dan etanol 40% bernilai 544.51 g/mL.
- Daun Kayu bulan (*Pisonia alba* Span.) mengandung fenolik yang cukup tinggi yaitu 12.45, 16.22, 28.67 mg GAE/gr untuk konsentrasi ekstrak 40, 60 dan 80%.
- Pada skrining fitokimia daun Kayu bulan mempunyai kandungan metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, tannin dan saponin.

Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap uji antioksidan ekstrak daun Kayu bulan dengan menggunakan metode uji antioksidan yang lain contohnya FRAP sehingga dapat diperoleh hasil yang maksimal pada pengujian antioksidan dan dapat diuji aktivitas

biologis lainnya oleh karena masih banyak khasiat dari daun Kayu bulan yang belum diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Aruoma O.I. 1994. *Free radicals and antioxidant strategies in sports*. J Nutr Biochem 5: 370 - 381
- Biradar, Y.S. 2010. *TLC Densitometric Quantification of Vasicine, Vasicinone and Embelin from Adhatoda zeylanica Leaves and Embelia ribes Fruits* (Tesis).Halaman: 140.
- Ciulei, J. 1984. *Metodology for Analysis of vegetable and Drugs*.B Faculty of Pharmacy. pp 11-26.
- Conde, E.E., M.C. Cadahia, G. Vallejo, B.F.D. Simon Dan J.R.G. Adrados. 1997. *Low Molecular Weight Polyphenol in Cork Oh Quercus Suber*. J. Agric. Food Chem. **45**:2695-2700.
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta : Depkes RI. Hal. 10-11.
- Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. 2004. *Free Radical and antioxidant in human health: Current status and future prospect*. JAPI 52(10):794-804.
- Fengel, D., Wegener, G. 1984. Kayu : Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-Reaksi, Terjemahan oleh Hardjono Sastrohamidjojo, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta
- Fessenden, R .J dan Fessenden, J. S . 1986. *Kimia Organik. Edisi Ketiga*. Jilid 2. Erlangga.
- Gordon I. 1994. *Functional Food, Food Design, Pharmafood*. New York: Champman dan Hall.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*, Penerbit ITB : Bandung.
- Hatam F. 2013. Aktivitas Antioksidan Dari Ekstrak Kulit Nanas (*Ananas Comosus* (L) Merr). *Pharmacon* Jurnal Ilmiah Farmasi F-Mipa Unsrat. **2**: 9-12.
- Hembing, WK. 1994.*Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia. Jilid 3*. Pustaka Kartini. Jakarta.
- Kardono, L.B.S., N. Artanti, I.D. Dewiyanti, T. Basuki. 2003.*Selected Indonesian medicinal plants. Monographs and Descriptions. Vol. 1*. Gramedia Widiasarana Indonesia, Jakarta.hlm. 42-55.
- Kristianti, A. N, N. S. Aminah, M. Tanjung, B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Jurusan Kimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga. P.47-48.
- Ketaren, S. 1986. *Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan*. Cetakan Pertama. Jakarta : UI-Press.
- Kikuzaki, Nakatani. 1993 . *Antioxidant effects of some ginger constituents*. J. Food Science.
- Juniarti, O.D., Yuhernita. 2009. *Kandungan senyawa kimia, uji toksisitas (BSLT) dan antioksidan (1,1-diphenyl-2-pikrilhydrazyl) dari ekstrak daun saga*. Makara Sains. **13(1)**:50-54.
- Lapornik, B.,Prosek, M., Wondra, A.G. 2005. Comparison of Extracts Prepared from Plant by-Products Using Different Solvent and Ekstraktion Time. Journal of FoodEngineering.
- Marliana, S. D., V. Suryanti, Suyono. 2005. *Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (Sechium edule Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol*. Biofarmasi, 3 (1). Pp. 26-31.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata*. Penerbit ITB, Bandung.
- Muhilal. 1991. Teori radikal bebas dalam gizi dan kedokteran. *Cermin Dunia Kedokteran*. **73**: 9-11.

- Maulida R. 2007. *Aktivitas Antioksidan Rumpul Laut Caulerpa lentillifera*. SKRIPSI. Universitas Institut Pertanian Bogor.
- Melodita, R. 2011. *Identifikasi Pendahuluan Senyawa Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cincau Hitam Dengan Perlakuan Jenis Pelarut*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Murray, R.K. 2003. *Biokimia Klinik Edisi 4*. EGC: Jakarta
- Molyneux, P. 2004. *The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity*. J. Sci. Technol. **26 (2)** : 211-219. Narins, D.M.C. 1996. *Vitamin Dalam Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. Mahlan, L.K, hal 110-114.
- Narins, D.M.C. 1996. *Vitamin Dalam Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy*. Mahlan, L.K, hal 110-114.
- Oeinitan, J. 2013. *Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana Linn.) Hasil Pengadukan Dan Reflux*. Jurnal Ilmiah Mahasiswa Surabaya. **1(2)**: 1-2.
- Pire, Stanley, 1988. *Kimia Organik I*. ITB : Bandung
- Pokorny JN, MY anishlieva, Gordon. 2001. *Antioxidants in Food*. Boca Raton Boston New York Washington, DC: CRC Press.
- Rizvi, S.J.H., V.Rizvi .2008. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*, CRC Press. Page.60-66
- Shadmani, A., Azhar, I., Mazhar, F., Hassan, M.M., Ahmed, S.W., Ahmad, I., Usmanghani, K., and Shamin, S. 2004. Kinetic Studies On Zingiber Officinale. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. **17**, hal. 47-54.
- Syahbirini, G; I. Batubara, T. Setiawati dan L. Nulhakim. 2005. Senyawa aktif daun picung (Pangium edule Reinw) sebagai insektisida botani terhadap ulat grapyak (Spodoptera litura F) (Lepidoptera noctuida). *Prosiding Simposium Nasional Kimia Bahan alam XV*. Dep.Kimia, F.MIPA,IPB-HKBA, Bogor: 56-66.
- Sastrohamidjojo. H . 1996. *Sintesis Bahan alam*, Cetakan ke-1, Liberty, Yogyakarta
- Saifuddin. 2010. *Metode Penelitian*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar Offset.
- Sudarmadji, S., Bambang Haryono dan Suhardi. 1996. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Librty. Yogyakarta.
- Schetman, G. 1989. *The Influence of Smoking on Vitamin C Status In Adult*. Am. J. Public Health. **79**: 158-162.
- Shahidi, F. and N. Marian. 1995. *Food Phenolics, Sources Chemistry Effects Applications Technomic Publ., Lancaster, Basel*.
- Scott H., Jonathan P., Mary H., John W., Ming Qian. 2002. Free Radicals Scavenging Properties of Wheat Extracts. *J.Agric Food Chem*.
- Suryanto E. 2012. *Fitokimia Antioksidan*. Putra Media Nusantara, Surabaya.
- Steenis, C . 1978. *Flora* . Paradnya Paramita. Jakarta.
- Stevi G. Dungira., Dewa G. Katja., Vanda S. Kamu. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Fenolik Dari Buah Manggis (Garcinia mongostana L). Jurnal MIPA ONLINE **1 (1)** 11 – 15 . UNSRAT Manado.
- Takashi Miyake, Takayumi Shibamoto. 1997. *Antioxidant Activities of Natural Compound Found in Plants*. J. Agric. Food. Chem. **45**. 1819-1822. Yu, Liangli.
- Taylor, A. 1993. *Relationships Between Nutrition and Oxidation*. J. Am. Coll. Nutr. **12**, 138-146.
- Tobo, F.,Mufidah, Taebe, B., Mahmud, A.I. 2001. *Buku Pegangan*

- Laboratorium Fitokimia I*, UNHAS, Makassar, 1, 83.
- Tomas-Barberán, F. A., Cienfuegos-Jovellanos, E., Marín, A., Muguerza, B., Gil-Izquierdo, A., Cerdá, B., Zafrilla, P., Morillas, J., Mulero, J., Ibarra, A., Pasamar, M. A., Ramón, D., & Espín, J. C. 2007. A New Process To Develop a Cocoa Powder with Higher Flavonoid Monomer Content and Enhanced Bioavailability in Healthy Humans. *J Agric Food Chem*, **55**(10), 3926-3935.
- Vallisuta, O. (2012). *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. Shanghai : InTech. P. 30-32.
- Yuliastuti I., Jumina. 2002. “ *Pemodelan dan Sintesis Senyawa Penyerap Sinar UV 3,4-Dimetoksi Heksil Sinamat Berdasarkan Pendekatan KimiaKomputasi.*” *Proceeding Seminar Nasional*, FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta.
- Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita, Erowati, T. I. Uji Peredam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera*L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus*. 2001, **1**: 34-43