



UJI EFEKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN SAMBANG DARAH (*Excoecaria cochinchinensis* L.) MENGUNAKAN METODE DPPH

Rifka Angraini Anggai¹, Moh. Adam Mustapa^{2*}, Mahdalena Sy. Pakaya³, Frith F. Liberto⁴

^{1,2,3,4} Jurusan Farmasi, Fakultas Olahraga dan Kesehatan., Universitas Negeri Gorontalo,
Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

* Penulis Korespondensi. Email: mohmustapa@ung.ac.id (Phone/Whatshapp : 081356343065)

ABSTRACT

Free radicals are molecules that have one or more unpaired free electrons. These electrons are the cause of the highly reactive free radicals formation to cells in the human body. These free radical compounds can be stable if they bind to antioxidant compounds. The mechanism of action of antioxidants is by donating the contained electrons to free radicals so that the free radical compounds change to be more stable. Antioxidant compounds that can be used as inhibitors of free radicals can be derived from natural or artificial, but due to long-term side effects of artificial antioxidants, making antioxidants from natural ingredients is an alternative source. One of them is *Excoecaria cochinchinensis* L. which contains flavonoid compounds with its antioxidant properties. This study aimed to determine the potential of antioxidant compounds contained in *Excoecaria cochinchinensis* L. using the DPPH method. The method used was maceration using a methanol solvent. The method was followed by the separation method, in which the liquid-liquid partitioning using three different types of solvents, namely methanol, chloroform, and n-hexane. Each fraction was then subjected to antioxidant testing using UV-Vis spectrophotometry with a DPPH wavelength of 515 nm. The results showed that the methanol fraction had the best antioxidant activity indicated by an IC50 value of 2.203 ppm, the chloroform fraction was 4.24 ppm, and the n-hexane fraction was 42.92 ppm. Based on this value, the methanol fraction was included in the category of very strong antioxidants.

Keywords:

Excoecaria cochinchinensis L., Antioxidant, DPPH, IC50 (Inhibitory Concentration)

Received:
2024-02-01

Accepted:
2024-03-30

Online:
2024-03-30

ABSTRAK

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih dari satu elektron bebas tidak berpasangan. Elektron - elektron ini yang menjadi penyebab dari terbentuknya radikal bebas yang bersifat sangat reaktif terhadap sel dalam tubuh manusia. Senyawa radikal bebas ini dapat menjadi stabil jika berkaitan dengan senyawa antioksidan. Mekanisme kerja dari antioksidan yakni dengan cara menyumbangkan elektron yang dikandungnya kepada radikal bebas sehingga senyawa radikal bebas berubah menjadi lebih stabil. Senyawa antioksidan yang dapat digunakan sebagai penghambat radikal bebas bisa berasal dari alami maupun buatan sehingga menjadikan antioksidan dari bahan alami menjadi sumber alternatifnya. Salah satunya yakni tanaman sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.). Dalam tanaman ini terkandung senyawa flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi dari senyawa antioksidan yang terkandung dalam tanaman sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.) menggunakan metode DPPH. Metode yang digunakan yakni maserasi menggunakan pelarut metanol yang dilanjutkan metode pemisahan yakni partisi cair - cair menggunakan 3 jenis pelarut yang berbeda kepolarannya yakni metanol, kloroform, dan n-heksan. Masing - masing fraksi kemudian dilakukan pengujian antioksidan menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang DPPH yaitu 515 nm. Hasil penelitian menunjukkan pada fraksi metanol memiliki aktivitas antioksidan paling baik yang ditandai dengan nilai IC_{50} sebesar 2,203 ppm, sedangkan pada fraksi kloroform sebesar 4,24 ppm, dan fraksi n-heksan sebesar 42,92 ppm. Berdasarkan nilai tersebut maka fraksi metanol termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat.

Kata Kunci:

Ekstrak Daun Sambang Darah, Antioksidan, IC_{50} (*Inhibitory Concentration*)

Diterima:
01-02-2024

Disetujui:
30-03-2024

Online:
30-03-2024

1. Pendahuluan

Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih dari satu elektron bebas tidak berpasangan. Menurut penelitian oleh Umayu, elektron - elektron tidak berpasangan ini yang akan menyebabkan radikal bebas menjadi senyawa yang sangat reaktif terhadap sel yang terdapat dalam tubuh manusia, dengan cara mengikat elektron molekul sel. Dalam tubuh manusia diperlukan antioksidan eksogen atau antioksidan dari luar untuk mempertahankan tubuh, karena tubuh manusia tidak memiliki sistem pertahanan untuk menangkalkan radikal bebas yang berlebihan. Antioksidan sendiri dapat diperoleh baik secara alami maupun sintetik. Akan tetapi antioksidan sintetik dapat menimbulkan efek samping pada tubuh manusia, sehingga penggunaan antioksidan dari bahan alam dapat dijadikan alternatif karena keamanannya[8].

Antioksidan memiliki mekanisme kerja dengan cara menyumbangkan elektron yang dikandungnya kepada radikal bebas. Selain itu antioksidan juga bekerja sebagai inhibitor dalam menghambat oksidasi dengan radikal bebas reaktif membentuk senyawa nonradikal bebas yang tidak reaktif dan relatif stabil. Menurut jurnal penelitian Sami, senyawa flavonoid, tanin, polifenol, vitamin C, vitamin E, dan karotenoid merupakan senyawa yang berasal dari alami dengan potensi sebagai antioksidan. Senyawa seperti flavonoid mampu menangkap radikal bebas secara langsung melalui sumbangan atom hidrogen[1]. Menurut penelitian oleh Raden, efek yang ditimbulkan dari antioksidan dalam senyawa flavonoid dapat berfungsi untuk mencegah penyakit degeneratif dan penyakit kronis seperti jantung, kanker, arthritis, stroke dan penyakit Alzheimer. Sedangkan pada tanaman sendiri menurut Siska, flavonoid berfungsi

sebagai pengatur tumbuh, penangkal serangan penyakit, zat warna, dan penanda pada klasifikasi tanaman.

Pada penelitian ini menggunakan daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.), karena pada tanaman ini memiliki warna daun yang sangat mencolok. Pada penelitian Siska, menyebutkan bahwa pada daun sambang darah menunjukkan adanya khasiat untuk menghilangkan gatal – gatal, penghentian pendarahan, obat disentri, dan muntah darah.

Pada pengujian ini menggunakan metode DPPH dimana melihat adanya penurunan absorbansi yang terjadi akibat adanya pengikatan radikal bebas oleh antioksidan. Metode ini memiliki keunggulan yakni mudah, peka dan sederhana, serta sampel yang digunakan sedikit [11]. Parameter yang menjadi acuan dalam metode ini yaitu adanya perubahan warna dari ungu menjadi pudar kemudian kuning yang menandakan adanya penurunan absorptivitas dari molekul DPPH akibat berikatan dengan senyawa antioksidan. Dari hasil absorbansi tersebut kemudian dilihat nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*). Penelitian ini dilakukan untuk melihat adanya potensi daun sambang darah sebagai alternatif obat tradisional dengan menggunakan metode DPPH secara spektrofotometri UV-Vis.

2. Metode

2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu batang pengaduk, neraca analitik, kaca arloji, wadah maserasi, micropipet (*Perkin elmer*), gelas ukur (*Pyrex*), gelas beaker (*Pyrex*), kuvet (*Quartz*), vial, *rotary evaporator*, corong pisah (*Pyrex*), dan spektrofotometer UV-Vis (*Perkin elmer*).

2.2 Bahan

Bahan yang digunakan yakni ekstrak daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.), aquadest, kertas saring, pelarut *n*-heksan, kloroform, metanol, dan DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*)

2.3 Prosedur Penelitian

Sampel yang digunakan yakni daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.) yang diserbukkan. Sampel tersebut ditimbang sebanyak 200 gr dan dimasukkan ke dalam wadah maserasi lalu ditambahkan dengan pelarut metanol hingga seluruh sampel terendam. Proses maserasi berlangsung selama hari. Sampel tersebut disaring kemudian hasil filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Selanjutnya dilakukan pemisahan dengan metode partisi cair – cair menggunakan 3 pelarut yang berbeda yakni metanol, kloroform, dan *n*-heksan. Volume pelarut yang digunakan yakni 1 : 1 kemudian dilakukan pengadukan. Setelah proses pengadukan kedua fase yang terbentuk dipisahkan dan dilanjutkan dengan pelarut selanjutnya hingga didapatkan fraksi metanol, fraksi kloroform, dan fraksi *n*-heksan. Fraksi tersebut kembali dipekatkan hingga mendapatkan ekstrak kental.

Pada pembuatan larutan DPPH dengan konsentrasi 0,05 mM, dilarutkan 0,0019 gram serbuk DPPH ke dalam metanol 100 mL. Kemudian larutan DPPH tersebut ditentukan panjang gelombang maksimumnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pada penelitian ini, larutan ekstrak yang digunakan dibuat seri 5, 10, 15, 20, 25 ppm. Pada pengujian antioksidan, tiap ekstrak daun sambang darah yang telah dibuat 5 seri larutan diambil 2 mL dan ditambahkan dengan larutan DPPH sebanyak 2 mL, lalu dihomogenkan serta diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap. Kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang DPPH. Selanjutnya dihitung nilai persen inhibisi dari masing – masing ekstrak dan nilai IC₅₀ (*Inhibitory Concentration*).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Preparasi Sampel

Daun sambang darah yang digunakan pada penelitian ini dilakukan sortasi basah untuk memilih daun yang masih terlihat segar dan warnanya yang masih mencolok. Sampel kemudian dipotong menjadi ukuran yang lebih kecil lalu dirajang untuk mengurangi kadar air dari sampel tersebut. Sampel yang telah dirajang tersebut diserbukkan. Tujuan penyerbukkan tersebut untuk memperbesar luas permukaan dari sampel, yang akan memperbesar kontak antara pelarut dan sampel [3]. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi dikarenakan metodenya yang sederhana dan cocok dengan sampel yang tidak tahan panas seperti sampel berupa daun. Pelarut yang digunakan untuk maserasi yaitu metanol, dimana metanol memiliki kemampuan untuk menarik senyawa baik polar maupun non polar. Proses maserasi dilakukan dengan 2 kali pengulangan untuk memaksimalkan penarikan senyawa dalam sampel. Hasil maserasi yang didapatkan kemudian disaring untuk memisahkan filtrate dan residu. Residu yang didapatkan lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu titik didih pelarut metanol yakni 64,6 °C [15]. Berat ekstrak kental yang didapatkan sebanyak 26,7 gram. Proses selanjutnya yakni pemisahan menggunakan metode partisi cair-cair, dimana menurut Martina metode ini didasarkan pada sifat kelarutan komponen senyawa dalam dua atau lebih pelarut yang tidak saling bercampur. Metode ini dinilai memiliki keuntungan yakni prosesnya yang sederhana, biaya yang murah, serta cocok untuk sampel yang tidak tahan panas atau mudah menguap [13]. Pelarut yang digunakan yakni metanol, kloroform, dan *n*-heksan. Perbandingan volume pelarut yang digunakan yakni 1 : 1 dalam 100 mL keseluruhan volume pelarut. Hasil pemisahan kembali dipekatkan hingga mendapatkan ekstrak kental dari masing-masing fraksi.

Tabel 1. Persen Rendamen Ekstrak

Ekstrak	Berat Akhir (gram)	Persen Rendamen
<i>N</i> -heksan	3,5045	1,75 %
Kloroform	2,726	1,363 %
Metanol	20,4733	10,24 %

3.2 Hasil Uji Skrining Fitokimia

Tabel 2. Uji Skrining Fitokimia Daun Sambang Darah

Golongan Senyawa	Pereaksi	Perubahan Reaksi	Keterangan
Alkaloid	Pereaksi Meyer	Endapan Putih	Negatif Alkaloid
Flavonoid	Mg + HCl Pekat	Berubah Warna Merah	Positif Flavonoid
Saponin	Aquadest	Terbentuk busa	Positif Saponin
Steroid	Kloroform + H ₂ SO ₄	Berubah Warna Biru Kehijauan	Negatif Steroid
Triterpenoid	Kloroform + H ₂ SO ₄ + Asam Asetat	Berubah Warna Biru Kehijauan	Negatif Triterpenoid

Pada hasil uji skrining fitokimia daun sambang darah menunjukkan positif terkandung senyawa flavonoid dan saponin. Pada flavonoid ditandai dengan perubahan warna sampel menjadi merah sedangkan pada saponin ditandai dengan terbentuknya busa saat pengocokkan.

3.3 Pengujian Efektivitas Antioksidan

Pembuatan Larutan DPPH dan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan DPPH dengan konsentrasi 0,05 mM dibuat dengan melarutkan 0,0019 gram serbuk DPPH ke dalam metanol 100 mL. Larutan DPPH kemudian diambil sebanyak 2 mL lalu dimasukkan ke dalam vial dan ditambahkan metanol sebanyak 2 mL. Larutan dihomogenkan lalu diukur panjang gelombang pada rentang 400-800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [7]. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yakni pada panjang gelombang 515 nm. Hal ini sesuai dengan penelitian Prakash, dimana radikal DPPH memiliki warna komplementer ungu dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 515-520 nm.

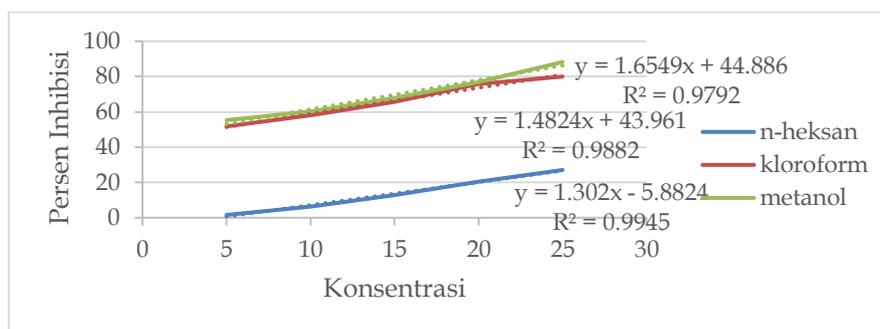
Pembuatan Larutan Uji Ekstrak dan Pengukuran Serapan

Pada pembuatan larutan uji masing-masing ekstrak (metanol, kloroform, dan *n*-heksan) dibuat dengan melarutkan 50 mg ekstrak ke dalam 50 mL metanol. Selanjutnya dibuat larutan uji dengan seri 5,10,15,20, dan 25 ppm.

Pengukuran serapan larutan uji dilakukan dengan mengambil 2 mL larutan dari tiap variasi konsentrasi dan dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan larutan DPPH 0,05 mM sebanyak 2 mL. Larutan uji kemudian dihomogenkan lalu diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum DPPH.

Adanya reaksi antioksidan dapat dilihat secara kasat mata, dimana warna ungu akan memudar dan digantikan warna kuning yang berasal dari gugus pikril [10]. Adanya pengurangan intensitas warna tersebut karena jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen [2]. Hal ini karena berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH.

Gambar 1. Grafik Persen Inhibisi Sampel



Pada grafik tersebut menampilkan nilai persentase inhibisi sampel dari ketiga jenis ekstrak yang berbeda. Adanya peningkatan persen inhibisi pada ekstrak metanol dan kloroform seiring dengan konsentrasinya yang makin tinggi sehingga bisa dikatakan kedua sampel tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang baik. Pada ekstrak metanol terjadi peningkatan dari konsentrasi 5 ppm dengan persen inhibisi sebesar 55,2941 % hingga pada konsentrasi 25 ppm sebesar 88,2352 %. Pada ekstrak kloroform dengan konsentrasi 5 ppm memiliki persen inhibisi sebesar 51,7647 % hingga pada konsentrasi 25 ppm sebesar 80 %. Berbeda halnya dengan ekstrak *n*-heksan, dikarenakan nilai persen inhibisinya yang berada di bawah 50 % yakni pada konsentrasi 5 ppm sebesar 1,5686 % dan pada konsentrasi 25 ppm sebesar 27,0588 %. Menurut Latifah suatu

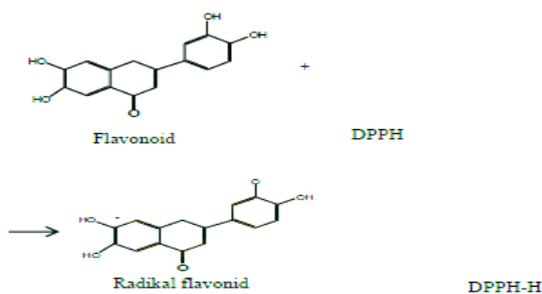
bahan dapat dikatakan aktif sebagai antioksidan bila persentasinya lebih atau sama dengan 50 % sehingga pada ekstrak *n*-heksan dapat dikatakan tidak memiliki aktivitas antioksidan.

Parameter yang selanjutnya digunakan yakni nilai IC_{50} (*Inhibitory Concentration*). Nilai IC_{50} menunjukkan konsentrasi suatu antioksidan yang dapat menyebabkan 50% atau setengah konsentrasi dari radikal bebas.

Tabel 3. Nilai IC_{50} Ekstrak Daun Sambang Darah

Ekstrak	Nilai IC_{50} (ppm)
<i>N</i> -heksan	42,92
Kloroform	4,24
Metanol	2,203

Berdasarkan tabel tersebut ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} paling besar yakni 2,203 ppm dan ekstrak kloroform sebesar 4,24 ppm. Menurut Raden, semakin tinggi suatu konsentrasi antioksidan akan mempunyai nilai IC_{50} yang rendah. Pada ekstrak metanol memiliki nilai IC_{50} yang tinggi dikarenakan memiliki kandungan flavonoid yang tinggi sedangkan pada ekstrak kloroform memiliki kandungan aglikon yang bersifat kurang polar seperti isoflavon, flavanon, flavon, dan flavonol yang termetoksilasi sehingga cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform [5].



Gambar 3. Reaksi Senyawa Flavonoid dan DPPH

Senyawa radikal bebas (DPPH) yang bersifat sangat reaktif akan berikatan dengan senyawa yang bersifat sebagai antioksidan dalam hal ini flavonoid dengan cara menerima elektron atau hidrogen dari senyawa flavonoid sehingga akan menjadi stabil.

4. Kesimpulan dan Saran

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.) memiliki kemampuan yang efektif sebagai antioksidan dalam menangkal radikal bebas.
2. Ekstrak yang memiliki efektivitas antioksidan paling besar yakni pada ekstrak metanol dengan nilai IC_{50} sebesar 2,203 ppm, sedangkan pada ekstrak *n*-heksan sebesar 42,92 ppm, dan ekstrak kloroform sebesar 4,24 ppm.

4.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut ataupun identifikasi mengenai golongan senyawa yang terkandung dalam daun sambang darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.).
2. Perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi senyawa yang berperan dalam aktivitas antioksidan.
3. Dapat dilakukan pengembangan menjadi bentuk sediaan yang sesuai.

Referensi

- [1]. Arifin, B., Ibrahim, S. 2019. *Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid*. Padang: Jurnal Zarah Vol. 6. Universitas Andalas.
- [2]. Asih, I. A. R. A., Sudiarta I. W., & Suci, A. A. W. 2010. *Aktivitas Antioksidan Senyawa Golongan Flavonoid Ekstrak Etanol Daging Buah Terong Belanda (Solanum betaceium Cav.)*. Bali: Universitas Udayana.
- [3]. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [4]. Latifah. 2015. *Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan pada Ekstrak Rimpang Kencur (Kaempferia galangal L.) dengan Metode DPPH (1,1 – difenil-2-pikrilhidrazil)*. Malang: Universitas Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- [5]. Markham, K. R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung: ITB.
- [6]. Martina, R. 2018. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Ekstrak Metanol Sponge *Aaptos sp.** Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- [7]. Musfiroh, E & Syarief, S. H. 2012. *Uji Aktivitas Perendaman Radikal Bebas Nanopartikel Emas dengan Berbagai Konsentrasi sebagai Material Antiaging dalam Kosmetik*. UNESA Journal of Chemistry.
- [8]. Nur Ikhlas. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Kemangi (Ocimum americanum Linn.) dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- [9]. Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Journal of Analytical Chemistry. Medallion Laboratories: Analytical Progress.
- [10]. Prayoga, G. 2013. *Fraksinasi, Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak Teraktif Daun Sambang Darah (Excoecaria cochinchinensis L.)*. Pharmacon. 5: 41-48.
- [11]. Raden, N. 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sirsak (Annona muricata L.) dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)*. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta.
- [12]. Sami, F., Nur, S., Kursia., Gani, S., Sidupa, T. 2016. *Uji Aktivitas Antioksidan dari Beberapa Ekstrak Kulit Batang Jamblang (Syzygium cumini) Menggunakan Metode Perendaman Radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH)*. Makassar: Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar.
- [13]. Setiawan, I. 2010. *Optimasi Ekstrak Cair-Cair Fraksi Etanol Daun Dandang Gendis (Clinacanthus mutans)*. Bandung: IPB.
- [14]. Siska, O., Ma'aruf, Y., Etika, S. 2013. *Isolasi dan Karakterisasi Flavonoid dari Daun Sambang Darah (Excoecaria cochinchinensis L.)*. Sumatera Barat: Universitas Negeri Padang.
- [15]. Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung: ITB.
- [16]. Umayah, E & Amrun, M. 2007. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Naga (Hylocereus undatus Haw.)*. Jurnal Ilmu Dasar Vol. 8. No. 1.