

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METHANOL KLIKA ANAK DARA (*Croton oblongus* Burm) MENGGUNAKAN METODE DPPH

Nurhikma Awaluddin, Sri Wahyuningsih
Jurusan Farmasi FATERSI, Universitas Megarezky
E-mail: hykma.awaluddin@gmail.com; 085211122291

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai penentuan aktivitas antioksidan ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.). Penentuan dilakukan dengan menggunakan 3 metode yaitu metode DPPH, FRAP, dan CUPRAC. Penelitian bertujuan untuk membandingkan antara setiap metode terhadap kemampuan aktivitas antioksidan klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.). Ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) hasil maserasi dibuat dalam 5 konsentrasi yaitu 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, dan 250 µg/ml yang kemudian ditambahkan pereaksi setiap metode dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum masing-masing yaitu 515,5 nm untuk metode DPPH, 582 nm untuk metode FRAP, dan 452 untuk metode CUPRAC. Sebagai pembanding digunakan Trolox[®] yang merupakan senyawa antioksidan murni. Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk metode DPPH konsentrasi sampel berbanding lurus dengan persen peredaman dimana semakin besar konsentrasi semakin tinggi pula peredaman radikal bebas DPPH, sebaliknya untuk metode FRAP dan CUPRAC semakin besar konsentrasi semakin rendah peredaman radikal bebas. Berdasarkan persamaan regresi linear menunjukkan bahwa ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ untuk metode DPPH yaitu 91,96 µg/ml sedangkan IC₅₀ Trolox[®] untuk metode DPPH yaitu 29,8 µg/ml, untuk metode FRAP IC₅₀ ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) sebesar 419,3 µg/ml sedangkan IC₅₀ Trolox[®] yaitu 407,9 µg/ml, dan untuk metode CUPRAC ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ 130,9 µg/ml sedangkan IC₅₀ Trolox[®] yaitu 97,8 µg/ml.

Kata Kunci : Antioksidan, *Croton oblongus* Burm.f. , DPPH

PENDAHULUAN

Oksidasi merupakan suatu reaksi kimia yang mentransfer elektron dari satu zat ke oksidator. Reaksi oksidasi dapat menghasilkan radikal bebas dan memicu reaksi berantai, menyebabkan kerusakan sel dalam tubuh. Radikal bebas sangat berbahaya karena dapat merusak jaringan tubuh yang dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti kanker, tekanan

darah tinggi, jantung koroner, diabetes melitus, katarak, proses penuaan dini, dan lain-lain (Haila, 1999; Buratti, *et al.*, 2001; Chang, *et al.*, 2002).

Radikal bebas adalah spesi kimia yang memiliki pasangan elektron bebas di kulit terluar sehingga sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat, atau DNA. Reaksi antara radikal bebas dan molekul itu berujung pada timbulnya

suatu penyakit (Sofia, 2005).

Penggunaan senyawa antioksidan saat ini semakin meluas seiring dengan semakin besarnya pemahaman masyarakat tentang peranannya dalam menghambat penyakit degeneratif seperti penyakit jantung, arteriosclerosis, kanker, serta gejala penuaan. (Tahir dkk, 2008).

Beberapa tanaman dan buah-buahan terbukti berpotensi sebagai antioksidan karena mengandung berbagai zat seperti karoten, flavonoid dan komponen fenolik lain, serta vitamin C dan E.

Salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai antioksidan yaitu anak dara (*Croton oblongus* Burm f.). Secara empiris masyarakat Sinjai, klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) dimanfaatkan sebagai masker wajah. Masyarakat Dusun Bongkong Kabupaten Sinjai Tengah telah secara turun-temurun menggunakan tanaman klika anak dara sebagai bedak dingin, yang dipercaya memiliki khasiat mengencangkan kulit.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) dengan menggunakan 3 metode penentuan antioksidan, yaitu DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*), CUPRAC (*cupricreducing antioxidant capacity*), dan FRAP (*ferric*

reducing ability of plasma) dengan menentukan IC₅₀ sampel dari setiap metode.

METODE KERJA

Alat dan Bahan

Alat - alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah batang pengaduk, bejana maserasi, cawan porselin, gelas erlenmeyer (*Pyrex*[®]), gelas kimia (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), gelas piala (*Pyrex*[®]), gelas ukur (*Pyrex*[®]), mikropipet (*Socorex ISBA S.*[®]), labu tentukur (*Pyrex*[®]), vial, Ph meter, pipet tetes, pipet volume (*Pyrex*[®]), spektrofotometer UV-VIS (*Shimadzu UV 1601*[®]), timbangan analitik (*Presica*).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah AlCl₃, aquadest, buffer ammonium asetat PH 7, buffer asetat 300 mM PH 3,6 CuCl₂·2H₂O, Klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.), DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*), HCl, metanol, neokuproin etanolik, TPTZ (*2,4,6-tripyridyl-s-triazine*), Trolox[®], FeCl₃·6H₂O.

Prosedur Kerja

Ditimbang Sampel klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.) yang telah diserbukkan sebanyak 500 gram dimaserasi menggunakan penyari metanol sebanyak 1 L, ditutup dan dibiarkan selama 1x24 .Selanjutnya disaring lalu dipisahkan antara ampas dan filtrat. Ampas diekstraksi kembali dengan metanol yang baru dengan

jumlah yang sama. Larutan ekstrak metanol di vakum kemudian dikeringkan hingga diperoleh ekstrak kering sebanyak 17,971 g.

Penyiapan larutan uji

1) Pembuatan Larutan DPPH(*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*)

Ditimbang DPPH sebanyak 13,52 mg kemudian dilarutkan metanol dengan menggunakan labu ukur 100 ml sehingga kadarnya 0,343 mM.

2) Pembuatan larutan FRAP(*ferric reducing ability of plasma*)

Pereaksi FRAP dibuat dengan campuran bufer asetat 300 mM pH 3,6; TPTZ 10 mM dalam 40 ml HCl; dan 20 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan perbandingan 10:1:1.

3) Pembuatan larutan CUPRAC (*cupricreducing antioxidant capacity*)

Pereaksi CUPRAC dibuat dengan mencampurkan 1 ml $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; 1 ml neokuproin etanolik 0,0075 M; 1 ml bufer amonium asetat pH 7 1 M; dan 0,1 ml aquadest.

Uji Aktivitas Antioksidan

1) Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Ekstrak metanol tanaman dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, dan 250 $\mu\text{g/ml}$ ditambahkan 1ml DPPH. Larutan tersebut didiamkan selama 30menit pada suhu ruang yang terlindung cahaya dan diukur absorbansinya pada

panjang gelombang maksimum 515,5 nm. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan troloks[®] dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan 50 $\mu\text{g/ml}$ digunakan untuk membuat kurvakalibrasi.

2) Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Ekstrak metanol dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, dan 250 $\mu\text{g/ml}$ ditambahkan 4,5 ml pereaksi FRAP kemudian didiamkan selama 30 menit pada suhu 37°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 582nm. Replikasi dilakukan sebanyak 3 kali. Larutan troloks[®] dengan konsentrasi 100, 200, 300, 400, dan 500 $\mu\text{g/ml}$ digunakan untuk membuat kurva kalibrasi.

3) Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC

Ekstrak metanol dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 150 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, dan 250 $\mu\text{g/ml}$ ditambahkan 1 ml $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 M; 1 ml neokuproin etanolik 0,0075 M; 1 ml bufer amonium asetat pH 7 1M; dan 0,1 ml aquadest. Larutan didiamkan selama 1 jam tanpa terkena cahaya pada suhu kamar. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum 452 nm. Sebagai blangko digunakan campuran larutan tanpa ekstrak. Replikasi dilakukan

sebanyak 3 kali. Larutan troloks[®] dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 µg/ml digunakan untuk membuat kurvakalibrasi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Perhitungan IC₅₀ klika anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.)

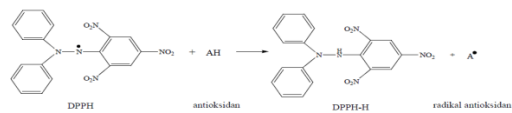
No	Metode	Konsentrasi (ppm)	% Penghambatan	Persamaan Garis	IC ₅₀
1.	DPPH	50	30,01	$y = 0,306x + 21,86$	91,96 µg/ml
		100	56,36		
		150	73,93		
		200	88,57		
		250	90,62		
2.	FRAP	50	93,80	$y = -0,115x + 98,23$	419,3 µg/ml
		100	85,45		
		150	79,06		
		200	77,32		
		250	69,03		
3.	CUPRAC	50	73,63	$y = -0,212x + 77,76$	130,9 µg/ml
		100	52,23		
		150	38,96		
		200	35,59		
		250	28,72		

Tabel 2. Perhitungan IC₅₀ troloks[®]

No	Metode	Konsentrasi (ppm)	% Penghambatan	Persamaan Garis	IC ₅₀
1.	DPPH	10	41,58	$y = 0,469x + 36,00$	29,8 µg/ml
		20	44,65		
		30	49,48		
		40	54,75		
		50	60,02		
2.	FRAP	100	93,7	$y = -0,11x + 94,78$	407,9 µg/ml
		200	92,4		
		300	91,2		
		400	90,2		
		500	89,0		
3.	CUPRAC	10	87,61	$y = -0,427x + 91,80$	97,8 µg/ml
		20	83,19		
		30	78,98		
		40	74,68		
		50	70,51		

Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Metode DPPH dipilih karena mudah digunakan, cepat, cukup teliti, baik digunakan dalam pelarut organik, dan sensitif untuk menguji aktivitas antioksidan dalam ekstrak tanaman (Apak *et al.* 2007). Metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) merupakan senyawa radikal nitrogen, DPPH akan mengambil atom hidrogen yang terdapat dalam suatu senyawa misalnya senyawa fenol. Mekanisme terjadinya reaksi DPPH ini berlangsung melalui mekanisme transfer elektron. Sebagaimana terlihat pada reaksi berikut :



Gambar 12. Reaksi DPPH dengan
Antioksidan

Perubahan tersebut dapat diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 515,5 nm, dan diplotkan terhadap konsentrasi. Penurunan intensitas warna yang terjadi disebabkan oleh berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH.

DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang stabil karena adanya resonansi elektron di keseluruhan molekul yang menunjukkan bahwa molekul stabil. Resonansi ini ditunjukkan dengan warna

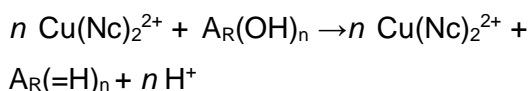
DPPH yang berwarna ungu. Senyawa antioksidan yang terkandung di dalam ekstrak akan merubah warna DPPH dari ungu menjadi kuning. Hal tersebut dikarenakan senyawa antioksidan memiliki elektron bebas yang tidak berpasangan sehingga dapat mengikat elektron bebas dari DPPH (Dehpour, Ebrahimzadeh, Fazel, dan Mohammad, 2009).

Metode DPPH sensitif untuk mengukur aktivitas antioksidan dalam ekstrak tanaman tapi kurang sensitif untuk mengukur aktivitas antioksidan selain dari senyawa fenol (Apak *et al.* 2007). Dari hasil kurva profil absorbansi terhadap konsentrasi dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi sampel akan menurunkan nilai absorbansi. Hal ini dikarenakan terjadinya proses stokiometri reaksi reduksi senyawa radikal bebas DPPH oleh senyawa yang memberikan donor hidrogen sehingga DPPH menjadi senyawa yang stabil.

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil IC_{50} ekstrak metanol klinka Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.) untuk metode DPPH yaitu 91,96 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan IC_{50} untuk troloks[®] yaitu 29,8 $\mu\text{g/ml}$ yang menunjukkan kekuatan aktivitas antioksidan ekstrak metanol klinka anak dara tergolong kuat terhadap DPPH.

Metode CUPRAC

Metode CUPRAC (*cupricreducing antioxidant capacity*) dipilih karena memiliki keuntungan dimana metode ini sederhana, cukup selektif, stabil, dan sensitif untuk jenis antioksidan tiol, serta dapat mengukur kemampuan senyawa fenol dalam sampel. Kapasitas antioksidan metode CUPRAC sebanding dengan jumlah total tembaga yang direduksi oleh antioksidan melalui transfer elektron. Antioksidan akan mengalami oksidasi sedangkan tembaga akan direduksi. Metode CUPRAC menggunakan bis (neokuproin) tembaga (II) ($\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$) sebagai pereaksi kromogenik. Pereaksi CUPRAC merupakan pereaksi yang selektif karena memiliki potensial reduksi yang rendah yaitu sebesar 0,17 V. Pereaksi $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ yang berwarna biru akan mengalami reduksi menjadi $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ yang berwarna kuning dengan reaksi:



Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil IC_{50} ekstrak metanol klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.) untuk metode CUPRAC IC_{50} ekstrak metanol klika Anak Dara yaitu 130,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sedangkan IC_{50} untuk troloks[®] yaitu 97,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yang menunjukkan

bahwa aktivitas antioksidan ekstrak metanol klika anak dara terhadap CUPRAC ini tergolong sedang.

Metode FRAP

Metode FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) dipilih karena memiliki keuntungan yaitu memberikan hasil cepat dan mudah dalam pengerjaannya, serta menunjukkan antioksidan dalam kompleks matriks. Kekuatan antioksidan diartikan sebagai daya reduksi senyawa antioksidan terhadap reagen FRAP. Kompleks besi (II) triptidiltriazin (Fe^{3+} -TPTZ) akan direduksi menjadi bentuk Fe^{2+} -TPTZ yang berwarna biru. Perubahan absorbansi pada contoh linear dengan konsentrasi antioksidan ekstrak dalam larutan dengan terbentuknya kompleks Fe^{2+} -TPTZ. daya reduksi akan berbanding lurus dengan terbentuknya Fe^{2+} , sehingga semakin banyak jumlah Fe^{2+} maka warna Fe^{2+} -TPTZ akan semakin pekat dan antioksidannya tinggi. Kompleks ini akan lebih stabil dalam pH asam, maka digunakan pH 3,6.

Dari penelitian yang dilakukan diperoleh hasil IC_{50} ekstrak metanol klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.) untuk metode FRAP yaitu IC_{50} 419,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sedangkan IC_{50} untuk troloks[®] yaitu 407,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yang menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak metanol klika anak dara terhadap FRAP ini tergolong lemah.

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian analisis data dan pembahasan dapat disimpulkan bahwa ;

1. Ekstrak metanol klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.) memiliki aktivitas antioksidan yang kuat terhadap DPPH, lemah terhadap FRAP dan memiliki aktivitas antioksidan yang sedang terhadap CUPRAC.

2. IC₅₀ ekstrak metanol klika Anak Dara (*Croton oblongus* Burm f.) untuk metode DPPH yaitu sebesar 91,96 µg/ml, untuk metode FRAP sebesar 419,3 µg/ml dan untuk metode CUPRAC sebesar 130,9 µg/ml.

B. Saran

Penulis berharap ada penelitian selanjutnya yaitu isolasi senyawa antioksidan yang ada di dalam ekstrak metanol klika anak dara (*Croton oblongus* Burm f.).

KEPUSTAKAAN

- Apak R, Kubilai GI, Zyrek M, Karademir SE. "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing in the presence neocuproine: cuprac method". *J Agric Food*, 2004.
- Chang, L, Yen, Wen-Jhe., Huang, S. C. and Duh., Pir- Der. "Antioxidant activity of sesame coat". *Food Chemistry* 78, 2002.
- Dehpour, A.A., Ebrahimzadeh, M.A.,

Fazel, N.S., and Mohammad, N.S., 2009, Antioxidant Activity of Methanol Extract of Ferula Assafoetida and Its Essential Oil Composition, *Grasas Aceites*, 60(4), 405-412.

Hariyatimi. "Kemampuan Vitamin E sebagai Antioksidan terhadap Radikal Bebas pada Lanjut Usia". *Jurnal MIPA*. Universitas Muhammadiyah Surakarta, 2004.

Haila, K. "Effects of Carotenoids and Carotenoid-Tocopherol Interaction on Lipid Oxidation In Vitro". *University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology Helsinki*, 1999.

Sofia, D. "Antioksidan dan Radikal Bebas". <http://www.chem-istry>.

Tahir, M. Indariani dan M. Sitanggang. *165 Sansevieria Eksklusif*. Jakarta: PT Agromedia Pustaka, 2008.

Uppu, R.M., Murthy, S.N., Pryor, W.A., and Parinandi, N.L., 2010, *Free Radicals and Antioxidant Protocols*, Humana Press, New York, pp. 51-53

