JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS, Mei 2013, hlm. 51-60 Vol. 10 No. 1
ISSN : 1693-5683

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN MENGGUNAKAN RADIKAL 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH) DAN PENETAPAN KANDUNGAN FENOLIK TOTAL FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOLIK DAUN BENALU (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq.) YANG TUMBUH DI POHON KEPEL (*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook. f.)

WILLIGIS DANU PATRIA DAN C.J.SOEGIHARDJO

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

Abstract: *Antioxidant has the ability to capture free radicals. These free radicals can oxidize nucleic acids, proteins, lipids or DNA, causing degenerative diseases. Antioxidants compound found in plants such as phenolic acids, polyphenols and flavanoids would capture free radicals such as peroxide, hydroperoxide or lipid peroxyl and also inhibit the oxidative mechanisms that show degenerative diseases. Quercetin and quercetin 3-o-rhamnosida as constituents of mistletoes (Dendrophthoe pentandra (L.) Miq.), are able to provide antioxidant activity. Mistletoes dried and extracted with 70% ethanol, followed by fractionation with ethyl acetate. Antioxidant activity of ethyl acetate fraction from ethanol extract was calculated using DPPH method and obtained IC_{50} values. The results showed that the ethyl acetate fraction from ethanolic mistletoes leaf extract has antioxidant activity with IC_{50} value of (12.57 ± 0.7) mg / mL. The content of total phenolic (13.76±0.9) mg gallic acid equivalents per gram of ethyl acetate fraction from ethanol extract of leaves of the mistletoes.*

Keywords*: Antioxidant, misletoes leaf, Dendrophthoe pentandra, ethyl acetate fraction, ethanolic extract, DPPH, total phenolic..*

1. Pendahuluan

Oksigen dibawa oleh darah untuk proses metabolisme di dalam tubuh. Oksigen dapat membantu sel mengubah nutrisi menjadi energi, namun oksigen ini dapat teroksidasi sehingga terbentuk molekul yang tidak stabil karena metabolisme di dalam tubuh maupun faktor luar seperti merokok, polusi, dan lain sebagainya. Molekul tidak stabil tersebut lalu berubah menjadi sebuah radikal bebas. Radikal bebas ini sangat reaktif, sehingga menimbulkan banyak penyakit degeneratif pada manusia seperti kanker dan penyakit kardiovaskular serta dapat menyebabkan oksidatif yang menyerang protein, DNA, dan lipid (Jacobi and Burri, 1996).

Karakteristik utama antioksidan adalah kemampuan untuk menangkap radikal bebas. Radikal yang terkandung dalam sistem biologis dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lipid atau DNA dan menimbulkan penyakit degenaratif. Komponen antioksidan yang terdapat pada tanaman seperti asam fenolat, polifenol, dan flavanoid akan menangkap radikal bebas seperti peroksida, hidroperoksida atau lipid peroksil, dan juga menghambat mekanisme oksidatif yang menimbulkan penyakit degeneratif (Prakash, 2001).

Indonesia kaya akan berbagai keanekaragaman hayati yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai obat atau bahan baku obat. Survai tentang obat di Amerika Serikat yang diakui oleh *Food and Drug Administration* pada periode 1983-1994 menunjukkan bahwa 157 dari 520 (30%) jenis obat berasal dari bahan alam atau turunannya, di mana 61% senyawa antikanker yang diakui juga berasal dari bahan alam atau turunannya. Survei ini menunjukkan terdapat 119 senyawa yang digunakan sebagai obat yang berasal dari 90 spesies tumbuhan di dunia, di mana 77% dari hasil penelitian, tumbuhan digunakan secara

tradisional (*ethnomedicine*) (Cordell, 2000). Oleh karena itu, perlu adanya eksplorasi aktivitas tanaman obat sehingga memperkaya informasi tanaman obat.

Benalu adalah tumbuhan yang kurang diperhatikan karena sifatnya sebagai tumbuhan parasit. Tumbuhan benalu secara empiris memiliki khasiat sebagai antikanker. Benalu (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) juga memiliki aktivitas antioksidan, namun aktivitas antioksidannya dipengaruhi oleh tanaman inang yang ditumbuhinya. Benalu (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) pada inang mangga, teh, kenanga, dan belimbing memiliki nilai IC_{50} yang berbeda (Artanti, Widayati, dan Fajriah, 2009). Tanaman kepel diketahui memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan IC_{50} sebesar 6,43 µg/mL (Sunarni, Pramono, dan Asmah, 2007). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dalam penelitian ini ingin mengetahui seberapa besar aktivitas antioksidan benalu (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) pada tanaman kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl) Hook. f.). Untuk mendukung hasil aktivitas antioksidan yang didapatkan maka pada penelitian ini dilakukan penentuan jumlah fenolik total untuk mempresentasikan jumlah fenolik yang menyebabkan aktivitas antioksidan. Menurut Huang, Boxin, *and* Prior (2005) fenolik total ini memiliki korelasi yang baik dengan aktivitas antioksidan sehingga dapat dilakukan penelitian terhadap keduanya.

2. Bahan dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: daun benalu *(Dendrophthoe pentandra* L. Miq) yang diambil dari pohon kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl) Hook. f.*)* yang terdapat di taman Universitas Sanata Dharma, Kampus III, Paingan (Yogyakarta); akuades (Laboratorium Kimia Analisis Instrumental Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma); bahan kualitas *p.a.* E. Merck, yaitu: metanol, bahan kualitas *p.a.* Sigma Chem. Co., USA, yaitu: DPPH, reagen Folin-Ciocalteu, asam galat, dan kuersetin;bahan kualitas teknis dari Brataco Chemica, yaitu: wasbensin dan etil asetat; bahan kualitas teknis CV. General Laboratorium, yaitu: etanol 70%; dan *aluminium foil*.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: neraca analitik (Scaltec SBC 22, BP 160P), *vacuum rotary evaporator* (Junke & Kunkel), *waterbath* (labo-tech, Heraeus), *vortex* (Janke & Kunkel), spektrofotometer UV-Vis (Perkin Elmer Lamda 20), *blender*, corong *Buchner*, *oven*, mikropipet 10-1000µL; 1-10 mL (Acura 825, Socorex), tabung reaksi bertutup, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di laboratorium analisis (Pyrex-Germany dan Iwaki).

2. 1. Determinasi tumbuhan daun benalu (Dendrophthoe pentandra L. Miq)

Determinasi tanaman benalu dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Fitokimia Universitas Sanata Dharma, Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Determinasi tumbuhan ini untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian benar-benar tumbuhan benalu *(Dendrophthoe pentandra* L. Miq).

2.2. Pembuatan dan penyiapan bahan (simplisia)

a. Pengumpulan bahan.Tanaman benalu diperoleh dari halaman Universitas Sanata Dharma (Yogyakarta). Pengumpulan pada musim kemarau bulan Juli tahun 2012. Pemanenan dilakukan pada tumbuhan yang menjelang berbunga pada saat pagi hari.

b. Sortasi basah. Bahan baku dipisahkan dari bahan-bahan pengganggu seperti tanah, krikil, rumput, bagian tanaman yang tidak dibutuhkan (tangkai, biji, dan bunga), bagian dari tanaman lain (tangkai, daun, bunga dan biji inang), bahan yang rusak dan lain-lain.

c. Pencucian. Pencucian daun benalu dilakukan dengan menggunakan air mengalir yang berasal dari air sumur. Pencucian ini dilakukan sebanyak tiga kali.

d. Pengeringan. Daun benalu yang masih basah dikeringkan pada sinar matahari secara tidak langsung. Cara pengeringan adalah bahan dihamparkan di atas nampan bambu dengan diatur agar tidak terlalu menumpuk

dan diusahakan agar bahan (daun) tidak menggulung, kemudian ditutup kain hitam dan dilakukan penjemuran di bawah sinar matahari pada pukul 09.00 (pagi) sampai pukul 15.00 (sore). Posisi daun harus sering dibalik sehingga pemanasan dapat merata. Akhir pengeringan ditandai dengan mudah hancur bila simplisia diremas dengan tangan.

e. Sortasi kering. Sejumlah simplisia yang sudah kering dipisahkan dari bahan-bahan pengganggu seperti bagian tumbuhan yang tidak diperlukan atau daun yang rusak dan lain-lain.

f. Perajangan atau pembuataan serbuk simplisia. Daun benalu diserbuk dengan blender kemudian di ayak dengan ayakan nomor mesh 40.

g. Pengepakan dan penyimpanan. Sejumlah simplisia yang telah halus kemudian dibungkus dengan menggunakan kantong plastik kedap udara dengan cara dibungkus rapat. Penyimpanan dilakukan di suhu ruangan terhindar dari cahaya matahari.

2.3. Ekstraksi simplisia

Simplisia yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 30 g dan dituang ke dalam bejana maserasi, ditambah etanol 70% sampai terendam sempurna, dan dicampur homogen. Campuran dimaserasi pada suhu ruangan selama dua hari. Filtrat diperoleh melalui penyaringan dengan corong Buchner. Ampas penyaringan diremaserasi dengan etanol 70% secukupnya selama 2 hari kemudian disaring. Lalu hasil penyaringan filtrat diuapkan pelarutnya hingga diperoleh ekstak etanol daun benalu.

2.4. Pembuatan fraksi etil asetat

Ekstrak etanol daun benalu ditambah 300 mL air hangat dan di ekstraksi dengan corong pisah, yaitu cair-cair menggunakan wasbensin dengan perbandingan larutan ekstrak wasbensin (1:1 v/v), kemudian didiamkan hingga terpisah sempurna. Hasil partisi diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi wasbensin dan fraksi air. Selanjutnya, fraksi air diekstraksi cair-cair lagi menggunakan etil asetat dengan perbandingan larutan fraksi air-etil asetat (1:1 v/v) sehingga didapatkan fraksi air dan etil asetat. Setelah dipisahkan fraksi etil asetat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* dan *waterbath* hingga didapatkan ekstrak kental. Lalu hasil fraksi tersebut digunakan untuk analisis lebih lanjut.

2.5. Pembuatan larutan pembanding dan larutan uji

a. Pembuatan larutan DPPH. DPPH sebanyak 15,7 mg diambil dan dilarutkan metanol p.a ke dalam labu ukur 100 mL sehingga diperoleh larutan DPPH dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan tersebut ditutup dengan alumunium foil agar terlindung dari cahaya dan harus selalu dibuat baru.

b. Pembuatan larutan stok kuersetin. Kuersetin diambil 2,5 mg ke dalam labu takar 10,0 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas tanda.

c. Pembuatan larutan pembanding. Larutan stok kuersetin diambil sebanyak 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 10,0 mL, sehingga diperoleh konsentrasi larutan standar kuersetin sebesar 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; dan 15,0 μg/mL.

d. Pembuatan larutan uji

1) Larutan uji untuk aktivitas antioksidan. Fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 25,0 mg ke dalam labu takar 25,0 mL, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai batas tanda sebagai larutan stok. Larutan stok diambil sebanyak 2 mL ke dalam labu takar 10,0 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai batas tanda sebagai larutan intermediet. Larutan intermediet diambil sebanyak 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 mLke dalam labu takar 10,0 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai batas tanda. Konsentrasi larutan uji sebesar 6,05; 9,07; 12,10; 15,12; 18,14 μg/mL.

2) Larutan uji untuk penentuan kandungan fenolik total. Fraksi etil asetat ditimbang sebanyak 10,1 mg ke dalam labu takar 10,0 mL, lalu ditambahkan metanol p.a sampai batas tanda sehingga diperoleh

konsentrasi larutan uji sebesar 141,7 µg/mL.

e. Pembuatan larutan asam galat. Larutan asam galat dibuat dengan konsentrasi 500 µg/mL dalam akuades - metanol (1:1). Larutan asam galat diambil sebanyak 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; dan 3,0 mL ke dalam labu takar 10,0 mL, kemudian ditambahkan akuades - metanol (1:1) sampai batas tanda, sehingga diperoleh konsentrasi larutan baku asam galat sebesar 50; 75; 100; 125; dan 150 µg/mL.

2.6. Uji pendahuluan

a. Uji fenolik.Larutan uji dengan konsentrasi 750,0 µg/mL dan larutan pembanding asam galat 150,0 µg/mL diambil sebanyak 0,5 mL kemudian ditambahkan 2,5 mL pereaksi Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan akuades (1:10 v/v) kedalam tabung reaksi lalu didiamkan selama 10 menit. Larutan natrium karbonat 1 M ditambahkan sebanyak 7,5 mL, kemudian diamati warna larutan tersebut.

b. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan. Larutan DPPH diambil sebanyak 1 mL dimasukan ke dalam masing-masing tiga tabung reaksi. Larutan DPPH ditambahkan masing-masing dengan 1 mL metanol p.a, larutan pembanding kuersetin 37,5 µg/mL, dan larutan uji 200,0 µg/mL. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan dengan 3 mL metanol p.a. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik. Setelah 30 menit, amati warna yang terjadi dalam larutan tersebut.

2.7. Optimasi metode uji aktivitas antioksidan

a. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum. Larutan DPPH dimasukkan masing-masing 0,5; 1,0; 1,5 mL pada 3 labu ukur 10 mL. Ditambahkan larutan tersebut dengan metanol hingga tanda batas sehingga konsentrasi DPPH menjadi 0,020; 0,040; dan 0,080 mM. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik. Diamkan selama *OT*. Lalu dilakukan *scanning* panjang gelombang serapan maksimum dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 400-600 nm.

b. Penentuan *operating time* (*OT*). Larutan DPPH sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam masing-masing tiga labu ukur 5 mL, ditambahkan masing-masing dengan 1 mL larutan pembanding kuersetin 5, 10, dan 15 µg/mL. Selanjutnya, larutan tersebut ditambahkan dengan metanol p.a hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik. Setelah itu, dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang *scanning* hasil dari serapan panjang gelombang selama 1 jam. Dilakukan demikian juga untuk larutan uji 6, 12, dan 18 µg/mL.

2.8. Uji aktivitas antioksidan

a. Pengukuran absorbansi larutan DPPH (kontrol). Larutan DPPHdimasukkan sebanyak 2 mL dalam labu ukur 10,0 mL dan ditambahkan metanol *p.a* hingga tanda batas. Kemudian larutan tersebut dibaca absorbansinya pada saat *OT* dan panjang gelombang maksimum. Pengerjaan dilakukan sebanyak tiga kali. Larutan ini digunakan sebagai kontrol untuk menguji larutan pembanding dan larutan uji.

b. Pengukuran absorbansi larutan pembanding dan uji. Larutan DPPH sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL kemudian ditambah dengan 2 mL larutan pembanding dan uji pada berbagai seri konsentrasi yang telah dibuat. Selanjutnya, larutan tersebut ditambah dengan metanol hingga tanda batas. Larutan tersebut kemudian divortex selama 30 detik dan didiamkan selama *OT*. Larutan dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang maksimum hasil optimasi. Pengujian dilakukan dengan tiga kali replikasi.

2.9. Optimasi metode penetapan kandungan fenolik total

Optimasi metode penetapan kandungan fenolik total ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri sesuai dengan penelitian Rollando (2012).

a. Penentuan *OT*. Larutan asam galat sebanyak 0,5 mL 50; 100; dan 150 µg/mL ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-

Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:10 v/v). Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M. Setelah itu, dibaca absorbansinya dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 750 nm selama 30 menit.

b. Penentuan panjang gelombang maksimum. Larutan asam galat diambil sebanyak 0,5 mL 50, 100, dan 150 µg/mL ditambahkan dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:1 v/v). Larutan selanjutnya ditambahkan dengan 4,0 mL natrium karbonat 1 M. Diamkan selama *OT,* absorbansinya dibaca pada λ maksimum dengan spektrofotometer visibel pada panjang gelombang 600-800 nm.

2.10. Penetapan kandungan fenolik total

a. Pembuatan kurva baku asam galat. Larutan asam galat diambil sebanyak 0,5 mL 50, 75, 100, 125, dan 150 µg/mL ditambah dengan 5 mL reagen Folin-Ciocalteu yang telah diencerkan dengan air (1:1 v/v). Larutan selanjutnya ditambah dengan 4,0 mL natrium karbonat 1M. Setelah *OT,* absorbansinya dibaca pada λ maksimum terhadap blanko yang terdiri atas akuades - metanol *p.a* (1:1), reagen Folin-Ciocalteu dan larutan natrium karbonat 1M. Pengerjaan dilakukan tiga kali.

c. Estimasi kandungan fenolik total larutan uji. Diambil 0,5 mL larutan uji 750 µg/mL, lalu masing-masing dimasukkan ke dalam labu takar 10,0 mL dan dilanjutkan sebagaimana perlakuan pada pembuatan kurva baku asam galat . Kandungan fenolik total dinyatakan sebagai gram ekivalen asam galat (mg ekivalen asam galat per g fraksi etil asetat). Lakukan tiga kali replikasi.

2.11. Analisis Hasil

Aktivitas penangkapan radikal DPPH (%) dihitung dengan rumus :

$$\frac{Abs.\,kontrol - Abs.\,sampel\ (larutan\ pembanding/uji)}{Abs.\ kontrol}\ x100\ \%$$

Data aktivitas tersebut dianalisis dan dihitung nilai IC_{50} menggunakan persamaan regresi linear dengan sumbu x adalah konsentrasi larutan uji maupun pembanding, sedangkan sumbu y adalah % *IC*. Lalu dianalisis secara statistik untuk menentukan ada atau tidak adanya perbedaan bermakna antara IC_{50} larutan pembanding dan larutan uji.

Uji kandungan fenolik dinyatakan dengan mg ekivalen asam galat dalam per g fraksi etil asetat. Nilai tersebut didapatkan dari analisis regresi linier dengan data kurva baku secara intrapolasi.

3. Hasil dan Pembahasan

Determinasi tanaman bertujuan untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas tanaman yang akan digunakan dalam penelitian untuk menghindari terjadinya kesalahan dalam pengambilan sampel analisis fitokimia. Hasil determinasi menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah benalu (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq).

Daun benalu diperoleh dari beberapa pohon kepel yang ditumbuhi tumbuhan parasit benalu di kompleks Kampus Universitas Sanata Dharma, Desa Paingan, Kecamatan Maguwoharjo, Kabupaten Sleman, Yogyakarta. Daun benalu dipanen dengan kriteria-kriteria berikut ini, yaitu pada musim kemarau pada bulan Juli, saat tumbuhan berbunga pada pagi hari. Tumbuhan benalu dikumpulkan dan diambil daunnya yang masih segar, tidak kuning tanpa ada klasifikasi umur tanaman.

Penelitian ini digunakan sampel daun yang telah dikeringkan karena untuk mengurangi kerusakan senyawa dengan adanya enzim pada tanaman segar, selain itu kandungan air yang tinggi akan meningkatkan pertumbuhan mikro-organisme. Proses pengeringan dilakukan setelah penyortiran dan pencucian yang bertujuan untuk mengurangi kontaminasi dari benda asing yang mungkin akan menjadi pengacau dalam penelitian baik berupa debu, atau bagian tanaman lain. Proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan dan ditutup dengan kain hitam. Tumbuhan

ditutup kain hitam bertujuan untuk mengurangi UV yang mungkin dapat merusak senyawa antioksidan yang terdapat pada tanaman tersebut (Andayani, Lisawati dan Maimunah, 2008). Pengeringan dihentikan ketika daun sudah kering dengan tanda rapuh dan mudah diremas. Daun yang telah kering tersebut kemudian diserbuk dengan menggunakan blender sampai halus. Kemudian serbuk diayak dengan ayakan nomor mesh 40.

Kesuksesan dari hasil pengambilan komponen aktif dari tumbuhan didasarkan dari tipe pelarut yang digunakan dalam prosedur ekstraksi. Etanol dipilih sebagai pelarut karena lebih mempresentasikan jumlah polifenol yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak air, lebih efisien dalam menembus dinding sel dan menarik polifenol untuk keluar dalam sel, dan bersifat *preservative* terhadap mikroorganisme (Lapornik *et al.,* 2005). Etanol dengan konsentrasi 70% dengan 30 % air dipilih karena komponen bioaktif flavonoid memiliki konsentrasi lebih besar dibandingkan dengan etanol secara murni. Maserasi dipilih sebagai metode ekstraksi karena metode yang baik dalam ekstraksi tanpa bantuan panas. Bobot ekstrak etanol yang didapat adalah 14,7 g dan rendemen yang didapat dari ekstrak etanol daun benalu adalah 16,34 %. Hasil ekstrak yang berupa ekstrak kental tersebut disimpan di lemari pendingin untuk menjaga agar ekstrak tetap baik selama penyimpanan sampai dilakukan tahap selanjutnya.

Setelah didapatkan ekstrak kental etanol kemudian dilakukan ekstraksi kembali dengan *wasbensin*. Hal ini dimaksudkan agar menghilangkan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan pada tumbuhan seperti lipid dan klorofil. *Wasbensin* memiliki indeks polaritas 3,8 yang berarti bersifat sangat non polar, sehingga dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa non polar seperti klorofil, vitamin, minyak, lemak dan aglikon flavonoid yang non polar misalnya aglikon isoflavon dan termetoksilasi (Harborne, 1987). Fase air yang didapat kemudian di fraksinasi kembali dengan menggunakan etil asetat. Fraksi etilasetat kemudian diuapkan dengan menggunakan *vaccum rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak yang pekat. Fraksi etil asetat yang sudah dibungkus dimasukkan didalam desikator agar tidak terpapar lembab dan ditumbuhi jamur atau mikroba. Bobot fraksi etil asetat yang didapat sebesar 0,73 g dan rendemen fraksi etil asetat yang didapat adalah 0,81%.

3.1. Uji pendahuluan aktivitas antioksidan

Tujuan dilakukan uji pendahuluan ini adalah untuk mengetahui secara kualitatif aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun benalu (*Dendrophthoe pentandra (*L). Miq.). Prinsip dari metode DPPH dalam mengetahui aktivitas antioksidan adalah didasarkan dari reaksi reduksi dari radikal DPPH. Hasil uji pendahuluan menunjukkan warna larutan uji memberikan warna yang sama dengan kuersetin (kontrol positif) (Gambar 1). Ini berarti fraksi etanolik daun benalu mempunyai aktivitas antioksidan secara kualitatif.

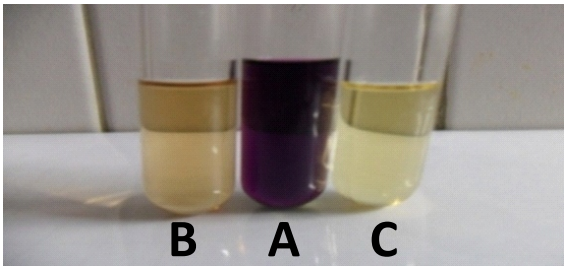
3.2. Uji pendahuluan fenolik

Tujuan dari uji ini adalah untuk mengetahui secara kualitatif kandungan senyawa fenolik dalam fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun benalu. Prinsip uji ini adalah reaksi oksidasi dari senyawa fenol oleh reagen molibdotungstat menghasilkan suatu produk yang berwarna biru disekitar panjang gelombang 745-750 nm. Hasil uji menunjukkan warna larutan uji memberikan warna yang sama dengan asam galat (kontrol positif) (Gambar 2). Ini berarti secara kualitatif fraksi etanolik daun benalu mengadung senyawa fenolik.

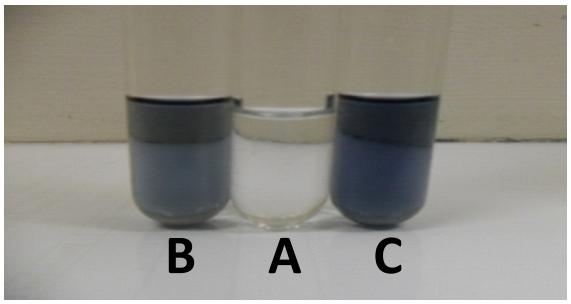
3.3. Hasil Optimasi Metode Uji Aktivitas Antioksidan

3.3.1. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ maks)

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk mendapatkan



Gambar 1. Hasil uji pendahuluan aktivitas antioksidan (A = kontrol negatif [blanko], B = larutan uji [fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu]+DPPH, C =kontrol positif [kuersetin] +DPPH



Gambar 2. Hasil uji pendahuluan fenolik (A = kontrol negatif [blanko], B = larutan uji [fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun benalu]+Folin Ciocalteu dan Na2CO3, C =kontrol positif [asam galat])

daerah serapan maksimum DPPH atau absorbsi maksimum untuk mendapatkan hasil lineritas dari pengukuran kurva baku. Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada tiga konsentrasi, yaitu pada konsentrasi tinggi, tengah dan rendah, yaitu 0,020; 0,040; dan 0,080 mM. Rata-rata panjang gelombang yang didapatkan dari ketiga konsentrasi tersebut adalah 515,5 nm. Seperti yang telah digunakan 515,5 nm (Soegihardjo and Rollando, 2012), 515 nm (Bondet, *et al.*, 1997).

3.3.2. Penentuan Operating Time

Penentuan *operating time* dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan waktu optimum dimana reaksi antara baku pembanding (kuersetin) dan larutan uji (fraksi etil asetat ekstrak etanol) terhadap reagen (DPPH) yang diberikan. Penentuan *Operating time* didasarkan dari waktu di mana absorbansi dari baku pembanding dan larutan uji terhadap reagen mulai stabil atau selisih absorbansi mulai kecil antara selang waktu yang diujikan. OT yang didapat adalah 30 menit pada λ maksimal 515,5 nm.

3.4. Hasil Estimasi Aktivitas Antioksidan dengan Radikal DPPH

Uji aktivias antioksidan dilakukan dengan metode penangkapan radikal (*radical scavenging*) terhadap radikal 2,2-difenil-1-pikril hidrazil (DPPH). Prinsip metode ini adalah melihat kemampuan antioksidan dengan mengukur pengurangan intensitas warna dari DPPH akibat penangkapan elektron radikal DPPH oleh antioksidan yang menjadi berikatan dengan hidrogennya DPPH-H. Hasil dari pengurangan warna ini merupakan stokiometri terhadap jumlah dari elektron yang ditangkap (Bondet, *et al*., 1997).

$$DPPH\bullet + AH \leftrightarrow DPPHH + A\bullet$$

Sebagai blangko adalah pelarut yang digunakan dalam mengukur dengan spektrofotometri visibel. Pelarut yang digunakan adalah metanol. Digunakan metanol karena metanol terbukti tidak mengganggu (interferensi) dalam reaksi DPPH (Molyneux, 2004). Pengukuran dilakukan dalam panjang gelombang maksimum hasil *scanning*, yaitu 515,5 nm. Berkurangnya intensitas warna DPPH berjalan dengan stokiometri, yaitu sebanding dengan konsentrasi senyawa antioksidan. Parameter yang digunakan untuk aktivitas antioksidan dengan metode penangkapan radikal DPPH ini adalah $IC_{50,}$ yakni konsentrasi senyawa uji yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%.

Dalam pembacaan hasil digunakan uji kebermaknaan untuk membandingan antara faktor eksperimental dengan statistik agar keputusan yang diambil benar. *Software* yang dipakai dalam pengujian dengan statistik adalah R 2.14.1. Uji yang pertama dilakukan adalah uji normalitas Shapiro-Wilk. Hasil statistik menunjukkan nilai p sebesar 0,9488 dan 0,4029 masing-masing untuk IC_{50} kuersetin dan fraksi etil asetat. Dapat disimpulkan bahwa IC_{50} kuersetin maupun fraksi etil asetat mengikuti distribusi normal.

Tabel I. Hasil perhitungan *IC*50 kuersetin dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu

Kuersetin					
Replikasi	IC_{50} (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD	CV	Interval kepercayaan (95%)
I	11,60	11,42	0,16	0,42	0,40
II	11,28				
III	11,40				
Fraksi etil asetat					
Replikasi	IC_{50} (µg/mL)	Rerata (µg/mL)	SD	CV	Interval kepercayaan (95%)
I	12,43	12,57	0,28	2,26	0,70
II	12,38				
III	12,90				

Tabel II. Perbandingan IC_{50} benalu dari berbagai inang

No	**Sampel**	**Ekstrak EtOH 80% IC_{50} (µg/mL)**	**Fraksi etil asetat ekstrak EtOH 70% (µg/mL)**
1	Benalu Belimbing*	21,0	
2	Benalu Mangga*	6,4	
3	Benalu Kenanga*	10,7	
4	Benalu Duku*	9,6	
5	Benalu Sirsak*	38,7	
6	Benalu Cemara**	9,4	
7	Benalu Mahkota Dewa*	25,2	
8	Benalu Teh*	11,1	
9	Benalu Kepel		12,57

*(Artanti, Darmawan, dan Fajriah, 2006) , ** (Darmawan, Artanti, Hanafi, 2006)

Sesuai dengan jenis penelitian uji parametrik yang digunakan adalah uji t tidak berpasangan. Dari hasil perhitungan dengan program R tersebut didapatkan nilai p adalah 0,0079. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa nilai rerata IC_{50} kuersetin berbeda dengan IC_{50} fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu.

Perbandingan IC_{50} benalu dari berbagai inang ditunjukkan pada tabel II. Aktivitas fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu masih di bawah benalu pada inang mangga, duku, kenanga, duku, teh. Perbedaan aktivitas antioksidan benalu ini dipengaruhi tanaman inang yang ditumbuhinya, karena sifatnya benalu yang semi parasit.

Fraksi etilasetat ekstrak etanolik daun benalu memiliki aktivitas yang sangat kuat (<50 µg/mL) walaupun memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kecil dari pada kuersetin dan benalu yang tumbuh dari berbagai inang seperti mangga, dan teh dilihat dari nilai Ic_{50}.

3.5. Hasil Optimasi Metode Uji Fenolik Total

3.5.1. Penentuan Operating time (OT)

Penentuan *operating time* dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan waktu

Tabel III. Hasil penentuan jumlah fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu

Replikasi	fenolik total (mg ekivalen)	rata-rata	SD	CV (%)	Rentang kepercayaan 95%
I	13,89				
II	14,05	13,76	0,3724	2,7065	0,92
III	13,34				

optimum dimana reaksi antara baku pembanding (asam galat) dan larutan uji (fraksi etil asetat ekstrak etanolik) terhadap reagen (DPPH) yang diberikan. Panjang gelombang maksimum yang dipakai adalah panjang gelombang yang telah didapatkan dalam penetapan lamda maks. Teoritis, yaitu 750 nm. Dari hasil ditunjukan *OT* yang didapatkan dari asam galat adalah 10 menit.

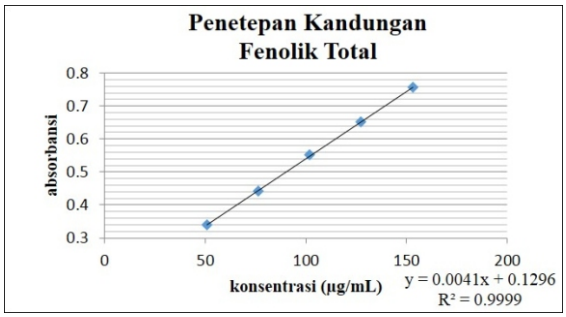
3.5.2. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum (λ maks)

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan bertujuan untuk mendapatkan daerah serapan maksimum DPPH atau absorbsi maksimum untuk mendapatkan hasil lineritas dari pengukuran kurva baku. Dalam penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan pada tiga konsentrasi, yaitu konsentrasi tinggi, tengah dan rendah, yaitu 50, 100, dan 150 µg/mL. Rata-rata panjang gelombang yang didapatkan dari ketiga konsentrasi tersebut adalah 750 nm.

3.5.3. Estimasi Kandungan Fenolik Total

Senyawa yang berperan utama dalam aktivitas antioksidan adalah senyawa fenolik. Senyawa fenolik banyak terdistribusi dalam tanaman, maka perlu dilakukan perhitungan kandungan fenolik total yang mungkin tedapat pada fraksi etil asetat ekstrak etanolik pada daun benalu tersebut. Prinsip metode kolorimetri Folin Ciocalteu adalah reaksi oksidasi yang cepat dari fenol dengan menggunakan alkali (biasanya natrium karbonat), di mana nilai yang didapat signifikan dengan konsentrasi ion fenolat (Cicco dan Latanzio, 2011).

Kompleks biru yang terbentuk terjadi dengan reaksi oksidasi reduksi dari ion fenolat senyawa uji dengan pereaksi fenol Folin-Ciocalteu. Dimana oksidasi dari senyawa fenol oleh reagen molibdotungstat dengan produk warna biru sekitar panjang gelombang 745-750 nm (Ronald, *et al.,* 2005).



Gambar 3. Kurva kalibrasi asam galat dalam penetapan fenolik total

Dari ketiga persamaan yang telah didapatkan dari tiga replikasi dipilih persamaan yang paling linear yang ditunjukkan oleh nilai r nya. Persamaan regresi linear yang paling baik diperoleh dari replikasi III dengan y = 0,004x + 0,1296 dan r sebesar 0,999. Berdasarkan perhitungan intrapolasi persamaan regresi linear y = 0,004x + 0,1296; maka didapatkan kandungan fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun benalu sebesar (13,76±0,92) mg ekivalen asam galat per g fraksi etil asetat dengan nilai *CV* sebesar 3,67 % yang termasuk baik karena kurang dari 20% (Kingstone, 2004)

5. Kesimpulan

Nilai aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun benalu dengan menggunakan radikal bebas DPPH yang dinyatakan sebagai *IC*50 sebesar (12,57 ±0,7) µg/mL (taraf kepercayaan 95%).

Kandungan fenolat total pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu yang dinyatakan dengan massa ekivalen asam galat sebesar (13,76±0,9) mg ekivalen asam galat per gram fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu (taraf kepercayaan 95%). Metode kandungan fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu belum tervalidasi.

Saran

Perlu dilakukan pengembangan formulasi yang tepat dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu *Dendrophthoe pentandra*. Perlu dilakukan pengujian antioksidan pada batang dan bunga benalu. Perlu dilakukan uji korelasi lebih lanjut melalui uji statistik antara kandungan fenolat total dengan aktivitas antioksidan. Perlu dilakukan uji akurasi sebagai validasi metode dalam kandungan fenolik total pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun benalu.

Daftar Pustaka

Andayani, R., Lisawati Y., dan Maimunah, 2008, *Penentuan Aktivitas Abtioksidan Kadar Fenolat Total dan Likopen Pada Buah Tomat (Solanum Lycopersicum L.)*, http://ffarmasi.unand.ac.id/pub/JSTFFeb2009%20_regina_.pdf, diakses tanggal 20 Desember 2012

Artanti, N., Darmawan A., Hanafi M., 2006, Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Antioksidan dari Ekstrak Air Daun Benalu *(Dendrophthoe* pentandra L. Miq.) yang Tumbuh pada Cemara. *jurnal.pdii.lipi.go.id, 43-51*.

Artanti, N., Widayati, R., dan Fajriah, S., 2009, Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Air dan Etanol Daun Benalu (*Dendrophtoe petandra* L. Miq) yang tumbuh pada berbagai inang, *JKTI,* vol 11 No 1, 38-40.

Bondet, V., Brand-Williams, W. *and* Berset, C., 1996, Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method, *Lebensm.-Wiss. U.-Technol*., vol. 30, 609–615.

Cicco, N., *and* Lattanzio, V., 2011, The Influence of Initial Carbonate Concentration on the Folin-Ciocalteu Micro-Method for the Determination of Phenolics with Low Concentration in the Presence of Methanol: A Comparative Study of Real-Time Monitored Reactions, *Am. J. Anal. Chem.,* pp.840-845.

Cordell, G.A., 2000, Biodiversity and Drug Discovery–a Symbiotic Relationship. *Phytochemistry*, vol 55, 463–380

Harborne, J.B., 1987, *Metode Fitokimia : Cara Modern Menganalisis Tumbuhan,* Ed. 2, diterjemahkan oleh Padmawinata, K., Penerbit ITB, Bandung, pp.47-109.

Huang, D., Boxin, O., *and* Prior, R.L., 2005, The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agr. Food Chem.*, pp.53, 1841-1856.

Jacobi, R.A., *and* Burri, B.J. 1996, Oxidative damage and defense. *Am. J. Clin. Nutr., 63*, 985–990.

Kingston, 2004, *Guidelines for The Validation of Analytical Methods for Active Constituent, Agricultural, and Veterinary Chemical Products*, APVMA.

Lapornik, B., Prosek, M., Wondra, A. G., 2005, Comparison of Extracts Prepared From Plant by-Products Using Different Solvents and Extraction Time. *J. Food Eng.,* 214–222.

Molyneux, P., 2003,The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, Vol. 26, No. 2, Mar.-Apr. 2004, pp. 212-217

Prakash, A., 2001, Antioxidant Activity, *takes you into the Heart of a Giant Resource* Volume 19 Number 2, 1,2.

Soegihardjo,C.J. and Rollando, 2012, Antioxidant activity by DPPH Method and Total Phenolic Content of Water Fraction of Methanolic Extract of *Piper betle* L. Leaf , ***Proceeding of The International Conference on Medical Plants (ICMP)***, October 11-13, 2012 in *Purwokerto*, Indonesia.

Ronald, L. Prior, Wu, Xianli, *and* Schaich, K., 2005, Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agr. Food Chem.,* 4290-4302.

Sunarni T., Pramono S., dan Asmah R., 2007, Antioxidant-free Radical Scavenging of Flavonoid from The Leaves of *Stelechocarpus burahol* (BI.) Hook. F. and Th., *Majalah Farmasi Indonesia,* 18(3), 111-116.