

UJI ANTIOKSIDAN DAN IDENTIFIKASI SENYAWA AKTIF DARI EKSTRAK KLOOROFORM DAUN TANAMAN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.).

ANTIOXIDANT TEST AND IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUNDS FROM CHLOROFORM EXTRACT OF BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) LEAF.

Minhatun Nafisah* dan Tukiran

*Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences
States University of Surabaya*

Jl. Ketintang Surabaya (60231), Telp. 031-8298761

*Corresponding author, e-mail: minhatunnafisah@gmail.com

Abstrak

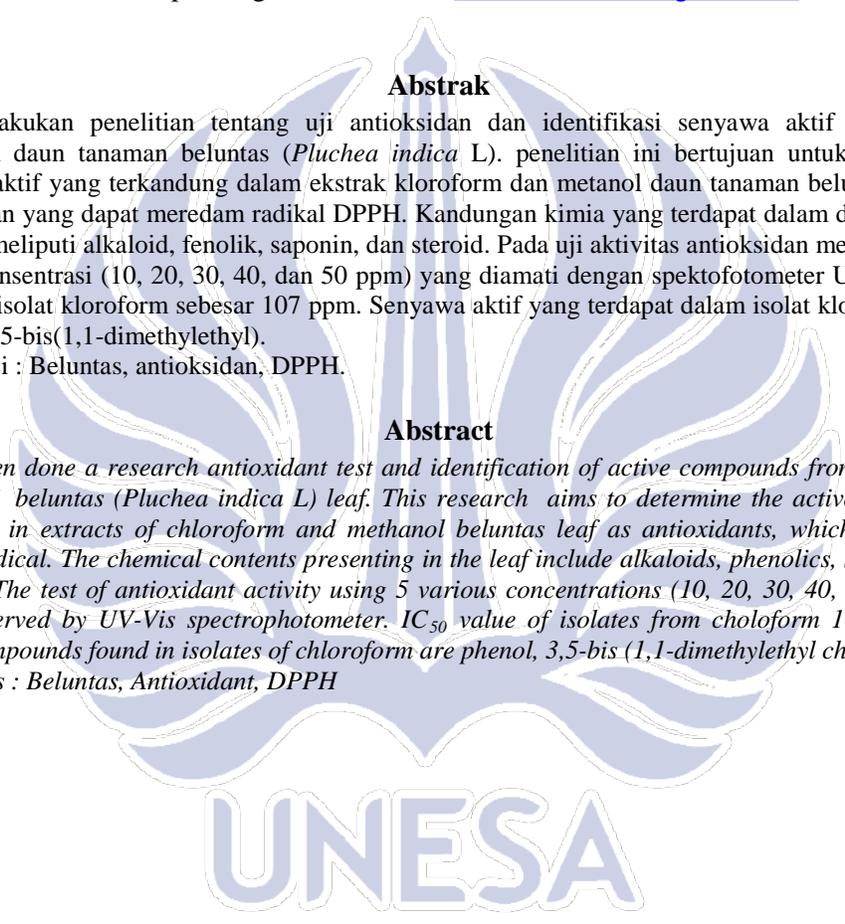
Telah dilakukan penelitian tentang uji antioksidan dan identifikasi senyawa aktif dari ekstrak kloroform daun tanaman beluntas (*Pluchea indica* L). penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak kloroform dan metanol daun tanaman beluntas sebagai antioksidan yang dapat meredam radikal DPPH. Kandungan kimia yang terdapat dalam daun tanaman beluntas meliputi alkaloid, fenolik, saponin, dan steroid. Pada uji aktivitas antioksidan menggunakan 5 variasi konsentrasi (10, 20, 30, 40, dan 50 ppm) yang diamati dengan spektrofotometer UV-Vis. Nilai IC_{50} dari isolat kloroform sebesar 107 ppm. Senyawa aktif yang terdapat dalam isolat kloroform ialah Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl).

Kata kunci : Beluntas, antioksidan, DPPH.

Abstract

*It had been done a research antioxidant test and identification of active compounds from chloroform extract of beluntas (*Pluchea indica* L) leaf. This research aims to determine the active compounds contained in extracts of chloroform and methanol beluntas leaf as antioxidants, which can reduce DPPH radical. The chemical contents presenting in the leaf include alkaloids, phenolics, saponins and steroids. The test of antioxidant activity using 5 various concentrations (10, 20, 30, 40, and 50 ppm) were observed by UV-Vis spectrophotometer. IC_{50} value of isolates from chloroform 107 ppm. The active compounds found in isolates of chloroform are phenol, 3,5-bis (1,1-dimethylethyl chloroform).*

Key words : Beluntas, Antioxidant, DPPH



UNESA

PENDAHULUAN

Antioksidan telah memegang peranan penting dalam kehidupan kita karena mampu mencegah atau memperlambat terjadinya proses oksidasi. istilah antioksidan tidak asing lagi ditelinga masyarakat Indonesia. Berbagai produk kosmetik, makanan, minuman menyebutkan bahwa produk tersebut mengandung antioksidan.

Antioksidan digolongkan menjadi 2 jenis yakni antioksidan sintetik dan alami. Senyawa antioksidan sintetik yang cukup dikenal adalah Butylated Hydroxy Toluena (BHT) dan Butylate Hydroxy Anisole (BHA) yang banyak dimanfaatkan dalam industri makanan dan minuman. Pada antioksidan sintetik selain harganya yang tidak murah juga mempunyai efek samping yang tidak diinginkan yaitu bersifat karsinogenik dan dapat menimbulkan kerusakan hati[1], sehingga permintaan terhadap antioksidan alami terus mengalami peningkatan.

Bahan pangan yang menjadi sumber antioksidan alami misalnya ditemukan pada tanaman seperti biji-bijian, buah, dan sayur-sayuran yang mempunyai manfaat bagi kesehatan. Antioksidan alami yang berasal dari tumbuhan ialah senyawa fenolik yang dapat berupa golongan flavonoid turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam organik polifungsional[2].

Tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) mempunyai manfaat dalam kehidupan sehari-hari. Studi literatur terdahulu tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.) dari famili *Asteraceae* memiliki kandungan kimia diantaranya alkaloid, minyak atsiri, tanin, flavonoid[3]. Tanaman beluntas ini berpotensi dimanfaatkan sebagai anti-inflamasi[4].

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan, peneliti ingin mengetahui aktivitas antioksidan daun tanaman beluntas dengan pelarut kloroform dan metanol dengan metode DPPH. Oleh karena itu, penulis mengambil judul "Uji antioksidan dan identifikasi senyawa aktif dari ekstrak kloroform dan metanol daun tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini ialah: gelas kimia, gelas ukur, vial besar, labu ukur, spatula, corong kaca, seperangkat alat penyaring Buchner, vacuum rotary evaporator, timbangan digital, penyemprot, pipa kapiler,

pipet tetes, pipet volum, penangas listrik, kasa, cawan petri, spektrofotometer UV (Pharma spec-1700 Shimadzu), spektrofotometer IR, GC-MS. Sementara bahan yang digunakan yaitu serbuk dari daun beberapa tanaman obat dari beluntas, heksana, kloroform, metanol, pelat KLT silika gel F₂₅₄, DPPH, HgCl₂, KI, asam salisilat, I₂, Bi(NO₃)₃, HNO₃ pekat, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, HCl pekat, pita Mg, asam asetat anhidrat, NaCl, gelatin, amonia dan aquades.

Prosedur Penelitian

a. Penyiapan sampel tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.)

Sampel daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang terkumpul dibersihkan dari kotoran yang menempel, kemudian dipotong kecil-kecil, selanjutnya dikeringkan dengan di angin-anginkan. Sampel yang sudah kering kemudian digiling hingga diperoleh serbuk halus yang siap untuk dimaserasi.

b. Tahap ekstraksi tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.)

Serbuk halus daun beluntas (*Pluchea indica* L.) sebanyak 1 kilogram dimaserasi secara berturut-turut dengan pelarut heksana, kloroform dan metanol dengan ketinggian pelarut ±1 cm di atas sampel. Maserasi didiamkan selama 24 jam pada suhu kamar. Hasil maserasi disaring menggunakan penyaring Buchner dan filtrat yang dihasilkan ditampung. Filtrat yang diperoleh diuapkan secara vakum menggunakan penguap putar rotary vacuum evaporator untuk memperoleh ekstrak kental.

c. Uji fitokimia pada tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.)

Ekstrak kental tanaman beluntas dari pelarut kloroform di dilakukan uji kandungan alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenolik.

d. Uji pendahuluan antioksidan penangkap radikal.

Ekstrak kloroform di KLT menggunakan fase diam silika gel F₂₅₄, dan fase gerak kloroform-etilasetat (9:1). Bercak yang terbentuk disemprotkan dengan larutan DPPH 0,05% dalam metanol. Bercak diperiksa 30 menit setelah penyemprotan menggunakan lampu UV_{254,360}.

e. Identifikasi senyawa aktif

Ekstrak kental kloroform dilakukan pemisahan senyawa dengan metode KCV, KKG, dan kromatografi preparatif menggunakan fase diam silika gel PF₂₅₄ dan fase gerak kloroform-etil asetat (9:1). Terhadap isolat aktif dilakukan analisis UV-Vis, FT-IR dan GC-MS.

f. Penentuan aktivitas antioksidan

Larutan uji isolat aktif dari ekstrak kloroform daun beluntas (*Pluchea indica* L.) dilarutkan dalam metanol dibuat dalam berbagai konsentrasi (10, 20, 30, 40, 50 ppm). Sebanyak 1 ml dari masing-masing larutan tersebut ditambah ke dalam 4 ml larutan DPPH 0,05 mM dalam metanol. Selanjutnya campuran dibiarkan selama 30 menit di ruang gelap, lalu diukur absorbansinya pada λ_{maks} . Selanjutnya ditentukan harga persen peredam absorbansi (% P) larutan DPPH serta harga

IC₅₀. Perlakuan yang sama untuk kontrol positif vitamin C.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sampel penelitian berupa daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang berasal dari satu lokasi yaitu di daerah ketintang, Surabaya. Serbuk kering seberat 1 kilogram dimaserasi berturut-turut dengan pelarut heksana, kloroform dan metanol. Hasil maserasi disaring dengan menggunakan penyaring Buchner. Filtrat yang diperoleh diuapkan dengan vakum dan menggunakan penguap putar rotary vacuum evaporator untuk memperoleh ekstrak kental.

Pengujian fitokimia ekstrak kloroform dan metanol.

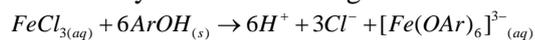
Hasil uji fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam daun tanaman beluntas. Hasil dari uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak kloroform daun tanaman beluntas (*Pluchea indica* L.).

No	Hasil Identifikasi	Pustaka	Keterangan Kloroform
1	Fenolik	Hijau, biru, hitam	+
2	Flavonoid	Kuning, merah	-
3	Tanin	Endapan	-
4	Saponin	Adanya busa stabil selama 20 detik	-
5	Alkaloid :		
	a. Dragendorf	Endapan merah	+
	b. Wagner	Endapan cokelat kemerahan	-
	c. Mayer	Endapan kuning	-
6	Steroid/ triterpen	Biru, hijau/ungu, jingga, kuning	+/-

Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa senyawa yang ada maupun tidak ada dalam daun tanaman beluntas dapat dijelaskan sebagai berikut. Hasil uji skrining fitokimia terhadap ekstrak kloroform diketahui tumbuhan ini mengandung senyawa fenolik, alkaloid (pereaksi Dragendorf) dan steroid, sedangkan ekstrak metanol terdapat senyawa fenolik, saponin, steroid, dan alkaloid (pereaksi Dragendorf, Wagner dan Mayer).

Untuk uji fenolik setelah penambahan $FeCl_3$ menimbulkan warna hijau kehitaman. Reaksi senyawa fenolik sebagai berikut:



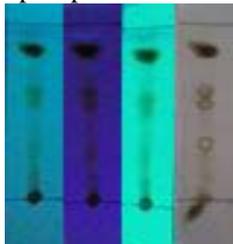
Uji saponin, sampel menunjukkan terbentuknya buih didalam larutan setelah penambahan aquades yang kemudian dikocok secara kuat. Timbulnya buih menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi gula dan senyawa lain.

Untuk alkaloid menggunakan pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorf. Pereaksi Mayer ($HgCl_2 + KI$), pereaksi Wagner ($I_2 + KI$), pereaksi Dragendorf ($Bi(NO_3)_3 + KI$). Adanya alkaloid masing-masing ditandai dengan terbentuknya endapan putih, coklat, dan jingga.

Uji seteroid juga menimbulkan warna hijau setelah penambahan asam sulfat pekat. Tujuan penambahan asam sulfat pekat yakni katalis untuk memutuskan ikatan karbonil pada asam asetat anhidrat yang didapatkan reaksi samping berupa CH_3COOH .

Pengujian hasil ekstraksi adanya senyawa antioksidan secara KLT.

Hasil uji menunjukan ekstrak kloroform dan metanol daun tanaman beluntas memberikan respon positif terhadap DPPH.



Gambar 1. Profil KLT ekstrak kloroform daun beluntas menggunakan eluen Kloroform:E.A (9,5:0,5). Bercak yang terbentuk diamati dengan berturut-turut: sinar tampak, lampu UV₂₅₄nm, lampu UV₃₆₆nm, DPPH 0,05mm.

Noda dengan nilai Rf 0,34 yang berwarna kuning menunjukkan positif antioksidan karena plat KLT setelah disemprot dengan DPPH timbul warna kuning dengan latar ungu.

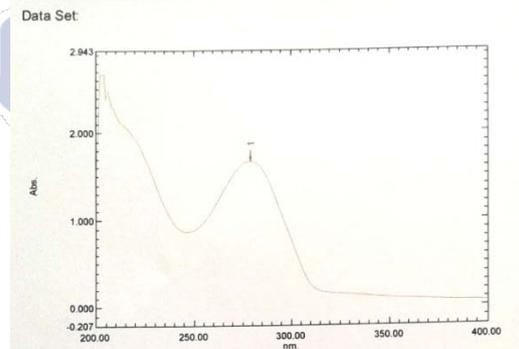
Pemurnian isolat

Ekstrak kloroform sebanyak 30 gram difraksinasi melalui KCV 1-5 menggunakan eluen yang sesuai yakni K:E.A (9:1) sehingga diperoleh 21 fraksi. Dari 21 fraksi di TLC dengan eluen K:E.A (9:1). Pada fraksi A₃, B₂, C₃, D₃, dan E₃ terdapat spot noda berwarna kuning yang kemudian dilakukan KKG 1-6 dengan eluen K:E.A (9:1) menghasilkan 20 fraksi. Pada fraksi a₂, b₂+b₃, c₂, d₂, dan e₂+e₃ terdapat spot noda berwarna kuning. Selanjutnya dipisahkan dengan KLTp sebanyak 4 kali, sehingga hasil spot noda terlihat hanya satu.



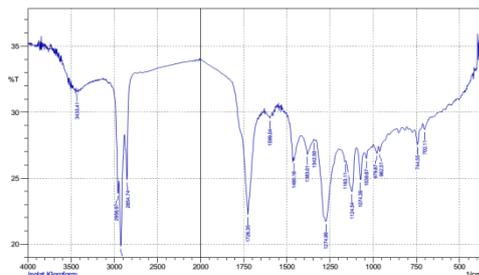
Gambar 2. Hasil KLTp spot noda tunggal, pelarut kloroform

Hasil isolat kloroform berdasarkan dari pengukuran menggunakan spektrum UV-Vis menunjukkan puncak pada serapan maksimum pada panjang gelombang 279.00 nm untuk isolat kloroform, yang ditunjukkan pada Gambar 4.



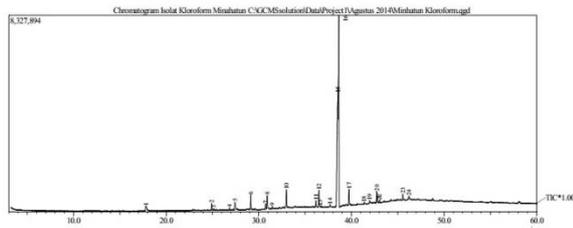
Gambar 3. Spektrum UV.Vis isolat kloroform

Berdasarkan dari hasil analisis FT-IR pada isolat kloroform memperlihatkan pita serapan tajam pada bilangan gelombang $\nu_{\text{maks}}=3433.41 \text{ cm}^{-1}$ yang diduga adanya gugus $-\text{OH}$. Pada serapan $\nu_{\text{maks}}=2956.97 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus regang C-H: $-\text{CH}_3$ dan $-\text{CH}_2-$. Bilangan gelombang $\nu_{\text{maks}}=1726.35 \text{ cm}^{-1}$ adanya gugus C=O. Adanya gugus C=C yang ditunjukkan pada bilangan gelombang $\nu_{\text{maks}}=1599.04 \text{ cm}^{-1}$. Bilangan gelombang $\nu_{\text{maks}}=1460.16-1342.50 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan gugus vibrasi tekuk C-H. Pada bilangan $\nu_{\text{maks}}=1274.99-1039.67 \text{ cm}^{-1}$ diduga adanya gugus C-O. Bilangan gelombang $\nu_{\text{maks}}=979.87-702.11 \text{ cm}^{-1}$ menunjukkan adanya gugus lentur (luar bidang)-C=C-H. Sesuai dengan hasil analisis spektrum inframerah menunjukkan adanya serapan dari gugus $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, C=O, C-O mendukung bahwa isolat diduga merupakan suatu senyawa minyak esensial berupa methyl ester. Isolat kloroform juga diduga merupakan senyawa phenol karena ada serapan yang menunjukkan adanya gugus $-\text{OH}$ dan adanya gugus C-H, yang ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektrum IR isolat kloroform

Berdasarkan dari hasil analisis GC-MS dapat diketahui isolat hasil isolasi belum murni namun diperoleh senyawa Phenol, 3,5-bis(1,1-dimetthylethyl) pada isolat kloroform, yang ditunjukkan pada Gambar 5.

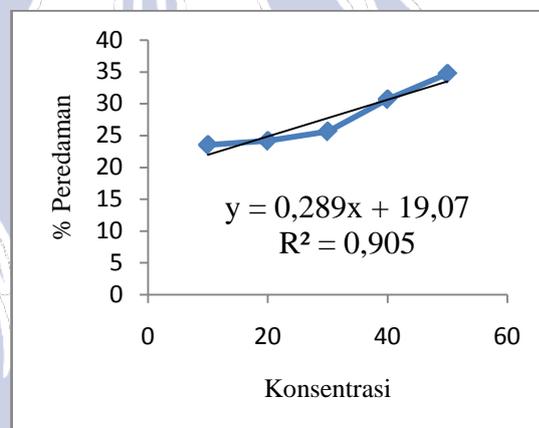


Gambar 5. Hasil instrumen GCMS isolat kloroform.

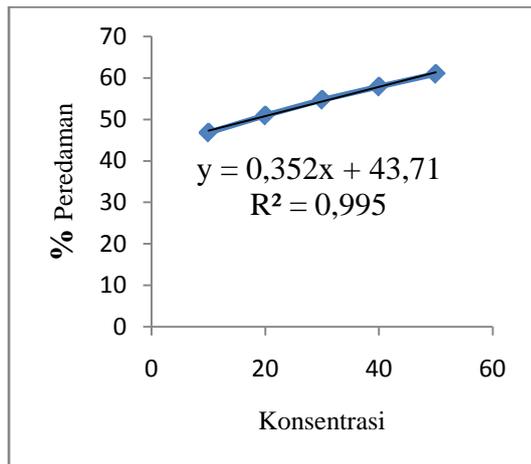
Pengujian aktifitas antioksidan dari isolat aktif.

Pada uji antioksidan isolat kloroform dan vitamin C digunakan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Masing-masing konsentrasi ditambahkan DPPH 0,05% dan ditunggu selama 30 menit. Kemudian dilakukan pemantauan menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui nilai absorbansi masing-masing konsentrasi. Hasil yang diperoleh kemudian dihitung IC_{50} .

IC_{50} diperoleh dari plotting terhadap persamaan regresi linier dengan sumbu (x) sebagai konsentrasi sampel, dan sumbu (y) sebagai persen peredaman. Kurva regresi linier isolat aktif dan vitamin C dengan metode DPPH dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 6. Kurva regresi linier isolat kloroform daun tanaman beluntas dan persen peredaman menggunakan metode DPPH.



Gambar 7. Kurva regresi linier Vitamin C dan persen peredaman menggunakan metode DPPH.

Pada Gambar 6 dan 7 menunjukkan bahwa hubungan antara konsentrasi isolat dengan persen peredaman terlihat nyata terjadi peningkatan dari konsentrasi rendah ke konsentrasi yang semakin tinggi. Dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula persen peredaman DPPH.

Hasil uji aktivitas antioksidan isolat dari daun tanaman beluntas menunjukkan bahwa isolat dari kloroform memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} yakni 107 $\mu\text{g/mL}$. Sedangkan nilai IC_{50} pada vitamin C, dimana vitamin C sebagai perbandingan (kontrol positif) memiliki IC_{50} 17 $\mu\text{g/mL}$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa identifikasi senyawa aktif ekstrak kloroform daun tanaman beluntas diperoleh senyawa Phenol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl) pada isolat kloroform. Dimana isolat yang didapatkan belum murni. Namun, isolat kloroform daun tanaman beluntas memiliki aktifitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 107 ppm menunjukkan isolat kloroform memiliki antioksidan yang kuat. Sedangkan untuk kontrol positif pada vitamin C nilai IC_{50} sebesar 17ppm yang menunjukkan bahwa vitamin C merupakan antioksidan sangat kuat.

DAFTAR PUSTAKA

- 1 Heo, S.J., Cha, S.H., Lee, K.W., Cho, S. K., & Jeon, Y.J. 2005. Antioxidant Activities of *Chlorophyta* and *Phaeophyta* from Jeju Island. *Algae* . Vol 20(3): pp 251-260.
- 2 Isnindar, Wahyuono, S., & Setyowati, E. P. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki Thunb.*) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil) . *Majalah Obat Tradisional*. Vol. 16(3): hal. 157-164.
- 3 Dalimartha, S. 1999. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Trubus Agriwidya.
- 4 Roslida, A., Erazuliana, A., & Zuraini, A. 2008. "Anti-Inflammatory And Antinociceptive Activities Of The Ethanolic Extract Of *Pluchea indica* (L) LESS LEAF". *Pharmacologyonline*. Vol. 2: pp 349-360.