

Uji Aktivitas Antioksidan serta Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak dan Fraksi Daun Paitan (*Tithonia Diversifolia* (Hemsley) A. Gray)

¹Riza Andriani Hanifa, ²Yani Lukmayani, ³Livia Syafnir

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas MIPA, Unisba, Jl. Tamansari No. 1 Bandung 40116

e-mail: ¹rizaandrianihanifa@ymail.com ²lukmayani@gmail.com

Abstrak: Telah dilakukan penelitian pengujian aktivitas antioksidan dan penetapan kadar flavonoid total daun paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). Ekstraksi serbuk simplisia dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 95%. Penapisan fitokimia telah dilakukan pada simplisia dan ekstrak. Fraksinasi telah dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan air. Pemantauan fraksi dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis dengan fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak etil asetat : n-heksan (7:3). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode spektrofotometri Ultra Ungu-sinar tampak. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, monoterpenoid/seskuiterpenoid, steroid/triterpenoid, kuinon dan saponin. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa fraksi n-heksan memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dengan nilai IC₅₀ 3,874 ppm, sedangkan nilai untuk fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan fraksi air berturut-turut adalah 3,992 ppm, 4,525 ppm dan 11,588 ppm. Hasil penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air berturut-turut adalah 4,209 mg QE/g ekstrak; 8,936 mg QE/g ekstrak; 5,224 mg QE/g ekstrak; dan 1,163 mg QE/g ekstrak.

Kata kunci: Daun paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray), ekstrak, fraksi n-heksan, aktivitas antioksidan, nilai IC₅₀.

A. Pendahuluan

Diabetes adalah kelainan metabolisme karbohidrat, dimana glukosa darah tidak dapat digunakan dengan baik, sehingga menyebabkan keadaan hiperglikemia (Dods, 1996: 27). Salah satu tumbuhan yang memiliki aktivitas sebagai antidiabetes adalah daun tumbuhan paitan. Di wilayah Lampung daun paitan yang dikenal dengan sebutan “daun insulin” digunakan sebagai penurun kadar gula darah. Penggunaan secara empiris, menggunakan 5 lembar daun paitan segar atau yang telah dikeringkan direbus dengan menggunakan air sebanyak 3 gelas hingga air rebusan menjadi 1 gelas lalu diminum.

Aktivitas antidiabetes dapat ditimbulkan dari aktivitas antioksidan, karena konsumsi antioksidan dalam jumlah yang memadai dapat menurunkan resiko terjadinya penyakit degeneratif seperti kardiovaskular, diabetes, kanker, aterosklerosis, dan osteoporosis (Winarsi, 2007: 14).

Pengujian aktivitas antioksidan yang dilakukan menggunakan metode DPPH (*Difenilpikril hidrazil*). Penelitian sebelumnya (Lie-Fen Shyur, 2005) telah melakukan pengujian aktivitas antioksidan tetapi hanya menggunakan ekstrak, pada penelitian ini pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak dan fraksi sehingga dapat diketahui antioksidan lebih aktif dalam bentuk ekstrak atau fraksi. Daun paitan memiliki aktivitas antioksidan karena daunnya memiliki senyawa flavonoid.

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tumbuhan yang memiliki zat hijau daun (klorofil), kecuali alga. Selain flavonoid tumbuhan paitan mengandung saponin, triterpenoid dan polifenol. Tetapi kadar flavonoid dalam tumbuhan ini belum diketahui.

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan diantara ekstrak dan fraksi daun paitan sampel manakah yang memiliki aktivitas

antioksidan lebih baik, serta berapa kadar flavonoid total dari ekstrak dan fraksi daun paitan.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang lebih baik antara ekstrak dan fraksi daun paitan serta mengetahui kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi daun paitan. Bagian dari tumbuhan paitan yang diteliti kadar flavonoidnya adalah bagian daun.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan yang lebih baik antara ekstrak dan fraksi daun paitan serta kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak dan fraksi daun paitan.

B. Landasan Teori

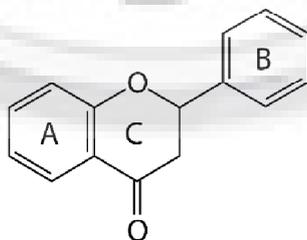
Tumbuhan paitan mengandung saponin, polifenol dan flavonoid pada bagian daun, kulit batang dan akarnya (Hutapea, 1994: 297). Metabolit sekunder lain adalah alkaloid, *cardiac glycoside* dan tannin (Kolawole, 2010: 272). Sedangkan kandungan-kandungan lain dari tumbuhan paitan adalah karbon dan nitrogen (Tobing, 2009: 154).



Gambar 1. Tumbuhan paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray)

Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid (flavonoid tanpa gula terikat) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988: 1).



Gambar 2. Struktur dasar flavonoid (Markham, 1988: 3)

Flavonoid biasanya terdapat sebagai flavonoid *O*-glikosida, pada senyawa tersebut satu gugus hidroksil flavonoid (atau lebih) terikat pada satu gula (atau lebih) dengan ikatan hemiasetal yang tak tahan asam. Pengaruh glikosilasi menyebabkan

flavonoid menjadi kurang reaktif dan lebih mudah larut dalam air, sifat ini memungkinkan penyimpanan flavonoid di dalam vakuola sel (Markham, 1988: 5).

Gula dapat terikat pada atom karbon flavonoid dan dalam hal ini gula tersebut terikat langsung pada inti benzena dengan suatu ikatan karbon-karbon yang tahan asam. Glikosida yang demikian disebut C-glikosida. Jenis gula yang terikat jauh lebih sedikit ketimbang jenis gula pada O-glikosida, biasanya dari jenis glukosa yang paling umum dan juga galaktosa. Jenis aglikon flavonoid yang terlibat pun sangat terbatas. Jadi, walaupun isoflavon, flavanon, dan flavonol kadang-kadang terdapat dalam bentuk C-glikosida, sebegitu jauh hanya flavon C-glikosida yang paling lazim ditemukan (Markham, 1988: 6-7).

Flavonoid merupakan kandungan khas tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga dan *hornwort*. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar bunga, buah buni dan biji. Hanya sedikit catatan yang melaporkan adanya flavonoid pada hewan, misalnya pada kelenjar bau berang-berang, 'propolis' (sekresi lebah), dan di dalam sayap kupu-kupu; itu pun dengan anggapan bahwa flavonoid tersebut berasal dari tumbuhan yang menjadi makanan hewan tersebut dan tidak dibiosintesis didalam tubuh mereka (Markham, 1988: 10).

Antioksidan

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas, atau suatu bahan yang berfungsi mencegah sistem biologi tubuh dari efek merugikan yang timbul dari proses ataupun reaksi yang menyebabkan oksidasi yang berlebihan. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, senyawa ini harus mencari elektron lain sebagai pasangan (Hernani, 2005: 3-5).

Antioksidan adalah senyawa yang berada pada konsentrasi lebih rendah dari substratnya secara signifikan dapat menunda atau mencegah oksidasi (Moein *et al.*, 2007: 83). Senyawa ini dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Usaha pencarian antioksidan alami terus dilakukan untuk menggantikan antioksidan sintetis yang masih diragukan akan tingkat keamanannya (Orhan, *et al.*, 2009: 276).

C. Metodologi Penelitian

Bahan penelitian yang digunakan adalah daun paitan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). Penyiapan simplisia kering dibuat dari daun paitan yang telah dikumpulkan, kemudian dilanjutkan dengan sortasi, pencucian, pengecilan ukuran simplisia dengan dirajang dan pengeringan. Karakterisasi simplisia terdiri dari pengujian parameter standar termasuk parameter spesifik dan non spesifik, dan penapisan fitokimia.

Ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 95% kemudian dipekatkan, terhadap ekstrak kental dilakukan fraksinasi. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan tiga pelarut dengan kepolaran yang berbeda, yaitu n-heksan, etil asetat dan air. Fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan lagi dengan *rotary vacuum evaporator*. Selanjutnya dilakukan pemantauan ekstrak dan fraksi secara KLT menggunakan fase diam plat silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak yang sesuai dengan penampak bercak lampu UV λ 254 nm dan 366 nm.

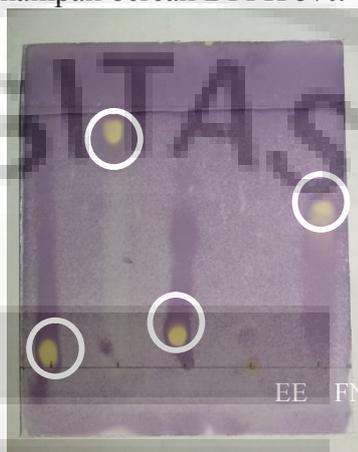
Terhadap ekstrak dan fraksi dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. Selain pengujian aktivitas

antioksidan, ekstrak dan fraksi ditetapkan kadar flavonoidnya. Pengukuran kadar flavonoid total dihitung menggunakan spektrofotometri Ultra Ungu-Sinar Tampak dengan panjang gelombang (λ) 510 nm terhadap ekstrak dan fraksi.

D. Hasil Penelitian

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak etanol dan ketiga fraksi yaitu fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air. Sebelum dilakukan pengujian aktivitas antioksidan, terlebih dahulu dilakukan pemantauan KLT terhadap masing-masing sampel dengan penampak bercak DPPH 5%.



Gambar 3. Kromatogram pemantauan ekstrak dan fraksi dengan penampak bercak DPPH 5%

Keterangan :

FN: Fraksi n-heksan, FE: Fraksi etil asetat, FA: Fraksi air, EE: Ekstrak etanol, K: Kuersetin

Dari hasil pemantauan tersebut, ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat memberikan hasil positif berupa warna bercak kuning dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan pereaksi DPPH 5%. Hasil ini menunjukkan adanya reaksi senyawa antioksidan dalam sampel dengan radikal bebas DPPH.

Selanjutnya terhadap sampel dilakukan pengujian aktivitas antioksidan. Metode pengujian yang dilakukan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Metode DPPH dipilih karena merupakan metode yang cepat, sederhana dan murah untuk mengukur aktivitas antioksidan (Prakash *et al.*, 2001: 68). Ketika suatu larutan DPPH dicampurkan dengan senyawa yang dapat memberikan atom hidrogen, molekul DPPH akan tereduksi, ditandai dengan berubahnya warna ungu menjadi kuning. Interaksi antara antioksidan dengan DPPH dapat berupa transfer elektron atau donor hidrogen, kedua interaksi tersebut akan menetralkan radikal bebas. Parameter yang digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian aktivitas antioksidan adalah nilai *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}) (Chang *et al.*, 2007: 408).

Larutan DPPH dalam metanol dibuat dengan konsentrasi 40 ppm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum yang didapatkan dari DPPH adalah 515 nm dengan absorbansinya 0,446. Perbandingan yang digunakan adalah vitamin C. Vitamin C merupakan suatu antioksidan yang larut dalam air, dengan rumus molekul $C_6H_8O_6$ yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang besar karena bersifat sebagai reduktor.

Sifat reduktor tersebut disebabkan oleh mudah terlepasnya atom-atom hidrogen pada gugus hidroksil yang terikat pada atom C₂ dan atom C₃ (atom-atom C pada ikatan rangkap), sehingga radikal bebas dapat dengan mudahnya menangkap dan membentuk radikal bebas tereduksi yang stabil (Soewoto, 2001: 114). Pada penelitian ini, penambahan ekstrak dan fraksi-fraksi daun paitan menurunkan intensitas warna ungu dari DPPH menjadi kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak dan fraksi-fraksi daun paitan memiliki aktivitas antioksidan.

Dari hasil kurva aktivitas antioksidan diperoleh persamaan garis linear sehingga diperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi ekstrak dan fraksi daun paitan yang dapat meredam atau menghambat radikal bebas sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ ditentukan dari kurva hubungan antara persen inhibisi terhadap larutan uji. IC₅₀ akan berbanding terbalik dengan kemampuan antioksidan substrat. Semakin kuat aktivitas antioksidan substrat maka nilai IC₅₀ nya semakin kecil.

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antioksidan

Bahan Uji	IC ₅₀
Ekstrak etanol	4,525 ppm
Fraksi air	11,588 ppm
Fraksi etil asetat	3,992 ppm
Fraksi n-heksan	3,874 ppm
Vitamin C	2,958 ppm

Berdasarkan **Tabel 1**, dapat dilihat bahwa nilai IC₅₀ dari fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan lebih baik dibandingkan dengan ekstrak daun paitan. Hal tersebut dikarenakan senyawa-senyawa yang terkandung didalam fraksi lebih murni dibandingkan dalam bentuk ekstraknya. Jika dibandingkan dengan nilai IC₅₀ dari pembanding yang digunakan yaitu vitamin C, nilai IC₅₀ dari ekstrak dan fraksi tidak lebih baik dari vitamin C. Hal tersebut berarti aktivitas antioksidan dari vitamin C lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak dan fraksi daun paitan. Dari ketiga fraksi tersebut nilai IC₅₀ dari fraksi air nilainya paling tinggi, hal tersebut berarti potensi aktivitas antioksidannya lebih lemah dibandingkan dengan fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan.

Bahan uji yang digunakan memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm. Hal tersebut sesuai dengan Jun (2006: 2118) yang mengklasifikasikan tingkat kekuatan antioksidan menggunakan metode uji DPPH dapat diklasifikasikan sebagai berikut (**Tabel 2**).

Tabel 2. Tingkat kekuatan antioksidan (Jun, 2006: 2118)

Intensitas	IC ₅₀
Sangat aktif	< 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Prinsip penetapan kadar flavonoid adalah adanya reaksi antara flavonoid dengan AlCl₃ kompleks berwarna kuning, dan dengan penambahan NaOH akan membentuk senyawa kompleks yang berwarna merah muda yang dapat diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510 nm (Rohman *et al.*, 2005: 136-140). Sebelum dilakukan

penetapan kadar flavonoid total terlebih dahulu dilakukan pemantauan KLT terhadap masing-masing sampel dengan penampak bercak AlCl_3 1%.



Gambar 4. Kromatogram pemantauan ekstrak dan fraksi dengan penampak bercak AlCl_3 1%

Keterangan :

FN: Fraksi n-heksan, FE: Fraksi etil asetat, FA: Fraksi air, EE: Ekstrak etanol, K: Kuersetin

Dari hasil pemantauan tersebut, ekstrak etanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat memberikan hasil positif berupa warna kuning terang yang sama dengan warna dari kuersetin dengan pereaksi AlCl_3 1%. Hasil ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid pada ketiga sampel tersebut.

Standar pengukuran yang digunakan adalah kuersetin karena merupakan suatu senyawa flavonol terbesar (Agestia dan Sugrani, 2009: 12). Kandungan flavonoid total dalam tumbuhan dinyatakan dalam QE (*quercetin equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan milligram kuersetin dalam 1 gram ekstrak.

Tabel 3. Hasil penetapan kadar flavonoid total

Bahan Uji	Kandungan Flavonoid Total (mg QE/g ekstrak)	Rata-rata Kandungan Flavonoid Total (mg QE/g ekstrak)
Ekstrak etanol	3,963	4,209
	4,454	
Fraksi n-heksan	8,095	8,936
	9,776	
Fraksi etil asetat	5,014	5,224
	5,434	
Fraksi air	1,303	1,163
	1,022	

Dari bahan yang digunakan yaitu ekstrak dan fraksi-fraksi tersebut, fraksi n-heksan memiliki kadar flavonoid terbanyak dikarenakan senyawa flavonoid lebih banyak terekstrak ke senyawa yang lebih non polar.

E. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan terbaik adalah fraksi n-heksan dengan nilai IC_{50} adalah 3,874 ppm sedangkan nilai untuk fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan fraksi air berturut-turut adalah 3,992 ppm, 4,525 ppm dan 11,588 ppm. Nilai kadar flavonoid untuk fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, ekstrak etanol dan fraksi air berturut-turut adalah 8,201 mg QE/g ekstrak, 5,224 mg QE/g ekstrak, 4,201 mg QE/g ekstrak dan 1,163 mg QE/g ekstrak.

Daftar Pustaka

- Agestia, R. dan Sugrani, A. (2009). *Kimia Organik Bahan Alam FLAVONOID (Quersetin)*, [Makalah]. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.
- Dods R.F. 1996. Diabetes Mellitus, In *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, Eds, Kaplan L.A, Pesce A.J, 3rd Edition, Mosby Inc, USA.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and Phytochemical Screening of Plants. *J. Pharm. Sci.* 55 (3).
- Hernani, R. (2005). *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Hutapea, J.R. (1994). *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Jilid III. Jakarta: Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Jun, M., H.Y., Hong, J., Wang, X., C.S. (2006). Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria lobate ohwi*). *The Journal of Food Science. Institute of Technologist.* 2117-2122.
- Kolawole, Ayodele. O. (2010). *Tithonia diversifolia, Cyperus rotundus and Hyptis suaveolensis Ethanol Extracts Combinatorially and Competitively Inhibit Affinity Purified Cowpea Storage Bruchid (Callosobrochus maculatus) Glutathione S-transferase* [Skripsi]. Nigeria: Departement of Biochemistry.
- Orhan, I. Kartal, M. Asaker, M.A. Senol, F.S. Yilmaz, G. and Sener, B. (2009). Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chemistru* 114.
- Prakash, A. Rigelhof, F. Miller, E. (2001). *Antioxicant activity*. Medallion Laboratories Analytical Progress. Minnesota.
- Rohman, A., Riyanto, S. (2005). *Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (Murraya paniculata (L) Jack) secara In Vitro*. Majalah Farmasi Indonesia.
- Soewoto, H. (2001). *Antioksidan Eksogen sebagai Lini Pertahanan Kedua dalam Menanggulangi Peran Radikal Bebas*. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI: Jakarta.
- Tobing, Esther. L. (2009). *Studi tentang Kandungan Nitrogen, Karbon © Organik dan C/N dari Kompos Tumbuhan Kembang Bulan (Tithonia diversifolia)* [Skripsi]. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Winarsi, H. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.