

**Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang  
(*Terminalia catappa* L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH)**

(Antioxidant Activity Determination in the Extract Ethanol Ketapang's Leave  
(*Terminalia catappa* L) by 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) Method)

Dwi Sri Rahayu, Dra. Dewi Kusriani M.Si, Dra. Enny Fachriyah M.Si.  
Labortorium Kimia Organik, Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro

**Abstrak**

Daun ketapang (*Terminalia catappa* L) mengandung banyak senyawa yang bersifat antioksidan yang dapat ditentukan dengan metode peredaman radikal bebas 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa dari ekstrak etanol daun ketapang, mengetahui adanya peredaman radikal bebas DPPH oleh ekstrak etanol daun ketapang dengan standar kuersetin, menentukan konsentrasi ekstrak etanol untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas DPPH ( $IC_{50}$ ). Isolasi senyawa aktif daun ketapang dilakukan dengan cara maserasi. Identifikasi golongan senyawa dilakukan dengan penapisan fitokimia. Pemisahan ekstrak etanol dengan metode kromatografi kolom. Aktivitas antioksidan dilakukan dengan peredaman warna radikal bebas DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Penelitian menunjukkan bahwa fraksi J hasil pemisahan kromatografi kolom memberikan peredaman warna DPPH yang paling besar. Kandungan senyawa ekstrak etanol antara lain flavonoid, alkaloid, saponin, kuinon, dan fenolik. Sedangkan fraksi J mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol adalah 172,523 ppm, sedangkan fraksi J adalah 347,729 ppm, sementara standar kuersetin sebesar 6,277 ppm.

Kata kunci : *Terminalia catappa* L, Antioksidan, DPPH

**Abstract**

Ketapang's leave (*Terminalia catappa* L) contain much antioxidant compounds. This research were isolated and identified compounds from ketapang's leave. Antioxidant activity evaluated by scavenging free radical 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) method and quersetin as standar. Antiradical DPPH were determine by concentration extract ethanol that causes 50% loss of the DPPH activity  $IC_{50}$ . Active compounds isolated by maceration and identified by screening phytochemistry. Antioxidant activity analized by scavenging free radical DPPH using spectrophotometry UV-Vis. Research showed that fraction J was the most scavenger of DPPH colour than others fraction coloumn. Extract ethanol contain flavonoid, alkaloid, saponin, quinon, and phenolic. Whereas, fraction J were contain flavonoid and alkaloid.  $IC_{50}$  extract ethanol were 172.523 ppm, fraction J were 347.729 ppm and quersetin were 6.277 ppm.

Keywords : *Terminalia catappa* L, Antioxidant, DPPH

## I. PENDAHULUAN

Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang baik untuk makanan maupun untuk pengobatan seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas (Boer, 2000). Stres oksidatif merupakan keadaan yang tidak seimbang antara jumlah molekul radikal bebas dan antioksidan di dalam tubuh (Trilaksani, 2003). Senyawa antioksidan merupakan suatu inhibitor yang digunakan untuk menghambat autooksidasi. Efek antioksidan senyawa fenolik dikarenakan sifat oksidasi yang berperan dalam menetralisasi radikal bebas (Panovska *et al*, 2005).

Ketapang merupakan tumbuhan dari famili *combretaceae* dilaporkan bahwa di dalam daun memiliki aktivitas antioksidan secara *in vitro* yang ditentukan dengan metode peredaman warna radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yang berwarna ungu menjadi kuning (Pauly, 2001).

Pada penelitian sebelumnya, telah diisolasi flavonoid glikosida dari daun ketapang dalam fraksi n-butanol yang memiliki aktivitas antioksidan (Lin *et al*, 1997). Oleh karena itu pada penelitian ini yang dilakukan adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dalam ekstrak etanol yang ditentukan menggunakan radikal bebas DPPH.

## II. METODE KERJA

### 2.1. Alat dan Bahan

#### 2.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian antara lain maserator, *rotary evaporator Buchi*, pipa kapiler, kolom kromatografi, chamber KLT, spektrofotometri UV-VIS, mikro pipet, gelas ukur, gelas beker.

#### 2.1.2 Bahan

Daun ketapang yang diperoleh dari kampus Tembalang Universitas Diponegoro. Pelarut yang digunakan untuk maserasi adalah etil asetat dan etanol. Pelarut untuk kromatografi kolom adalah n-heksan, kloroform, etil asetat, dan etanol. Kromatografi kolom menggunakan silika gel 60H. Pengembang kromatografi lapis tipis menggunakan n-butanol, asam asetat anhidrida dan akuades. Fasa diam kromatografi lapis tipis menggunakan silika gel 60GF<sub>254</sub>. Skrining fitokimia menggunakan merkuri klorida, kalium iodida, feri klorida 1%, asam klorida, serbuk magnesium, asam sulfat pekat, kloroform, ammonium hidroksida, asam asetat anhidrida. Pemudaran warna untuk penentuan aktivitas antioksidan dengan menggunakan DPPH. Standar antioksidan digunakan senyawa quersetin.

## **2.2. Metode Kerja**

### **2.2.1 Pembuatan ekstrak**

Serbuk daun ketapang 0,75 Kg dimaserasi menggunakan pelarut etil asetat dilanjutkan dengan etanol secara berurutan masing-masing selama 3x24 jam. Ekstrak etil asetat maupun etanol kemudian dipekatkan.

### **2.2.2 Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif Ekstrak Etanol dan Etil Asetat**

Ekstrak etanol dan etil asetat di lakukan KLT menggunakan campuran pelarut n-butanol, asam asetat anhidrida dan akuades. Perbandingan pelarut untuk ekstrak etil asetat yaitu 4:1:3, sedangkan untuk ekstrak etanol menggunakan perbandingan 4:1:5. Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan disemprot dengan larutan 0,05 mM DPPH dalam etanol. Uji positif yang bersifat anti radikal bebas menghasilkan bercak kuning dengan latar belakang ungu dalam waktu 20 menit. Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif juga dilakukan pada quersetin yang digunakan sebagai standar antioksidan. Ekstrak etanol memberikan peredaman terbesar terhadap perubahan warna DPPH, dilanjutkan pemisahan senyawa dengan kromatografi kolom.

### **2.2.3 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom**

Kromatografi kolom dibuat dari silika gel <sup>60</sup>H sebagai fasa diam. Adapun perbandingan campuran pelarut yang digunakan adalah n-heksan : kloroform : etil asetat yaitu 1 : 2 : 3, etil asetat, etil asetat : etanol yaitu (14 : 1), (12 : 3), (10 : 5), (8 : 7), (6 : 9), (4 : 11), (2 : 13) dan etanol. Fraksi-fraksi hasil kromatografi kolom dianalisis dengan KLT menggunakan campuran pelarut n-butanol, asam asetat anhidrida, akuades dengan perbandingan 4 : 1 : 5. Fraksi yang memiliki noda yang sama atau mirip dijadikan satu fraksi besar.

### **2.2.4 Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif pada Fraksi Kolom**

Fraksi kolom dilakukan KLT dengan campuran pelarut n-butanol, asam asetat anhidrida dan akuades dengan perbandingan 4 : 1 : 5. Setelah elusi selesai, lempeng dikeringkan dan disemprot dengan larutan 0,05 mM DPPH dalam etanol. Fraksi kolom yang memberikan peredaman terbesar terhadap perubahan warna DPPH dilanjutkan dengan penentuan aktivitas antioksidan secara kuantitatif.

## 2.2.5 Uji Antioksidan dengan Peredaman Warna DPPH

### a. Skринing Panjang Gelombang Maksimal Larutan DPPH 0,05 mM

Larutan 0,05 mM DPPH dalam etanol diukur panjang gelombang maksimum dan nilai absorbansinya. Larutan ini digunakan sebagai kontrol untuk menguji larutan ekstrak etanol dan fraksi kolom terpilih yang memberikan peredaman warna DPPH yang paling besar. Hal yang sama dilakukan pada kontrol untuk standar yaitu quersetin.

### b. Operating time Larutan Uji Ekstrak Daun Ketapang

Larutan uji dari ekstrak etanol dan fraksi kolom terpilih yang memberikan peredaman warna DPPH yang paling besar dibuat berbagai konsentrasi. Konsentrai ekstrak uji yang dibuat adalah 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% (b/v). Fraksi kolom 0,1% diambil untuk dilakukan *operating time*. *Operating time* dilakukan dengan cara 50  $\mu$ L ekstrak sampel ditambah larutan 0,05 mM DPPH dalam etanol sebanyak 3 mL. Larutan uji tersebut diukur pada menit ke-10, 20, 30, 40, 50, 60 pada panjang gelombang maksimum 515 nm yang telah di peroleh. Selisih absorbansi terbesar pada setiap waktu merupakan *operating time*.

### c. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara 3 mL larutan DPPH dalam etanol 0,05 mM ditambah dengan 50  $\mu$ L ekstrak larutan uji. Konsentrasi standar quersetin yang dibuat adalah 0,01% , 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05% (b/v). Campuran didiamkan selama waktu *operating time* yang telah diperoleh. Larutan ini kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm. Besarnya konsentrasi ekstrak larutan uji untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas ditentukan dengan nilai  $IC_{50}$ .  $IC_{50}$  dihitung dari persentase penghambatan serapan larutan ekstrak dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier.

## III. HASIL DAN PEMBAHASAN

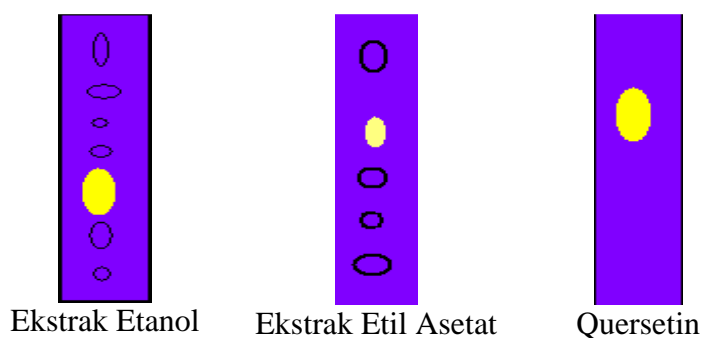
### 3.1 Pembuatan Ekstrak

Maserasi daun ketapang menghasilkan ekstrak kental etil asetat yang berwarna coklat tua dan ekstrak kental etanol yang berwarna coklat. Identifikasi golongan senyawa dengan penapisan fitokimia dalam ekstrak etil asetat terkandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan saponin. Sedangkan pada ekstrak etanol terkandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, kuinon dan fenolik.

### 3.2 Uji Kualitatif Antioksidan Ekstrak Etanol dan Etil Asetat

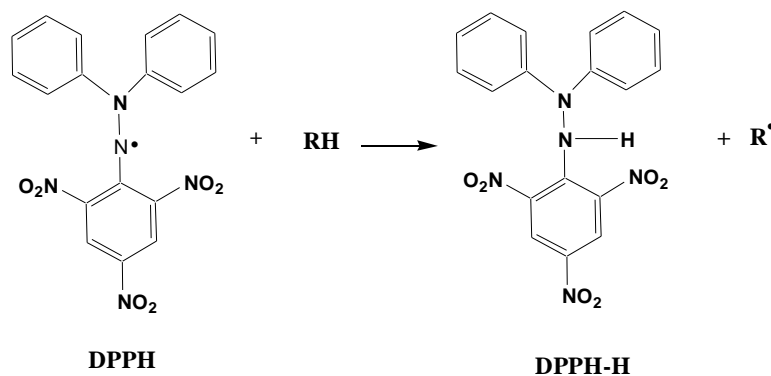
Uji antioksidan secara kualitatif dilakukan dengan KLT dan reaksi perubahan warna DPPH terhadap filtrat kental etanol dan etil asetat.

Hasil KLT terlihat bahwa pada noda ketiga dalam ekstrak etanol berubah warna menjadi kuning dengan latar belakang ungu. Sedangkan pada ekstrak etil asetat terlihat bahwa noda keempat menjadi kuning dengan latar belakang ungu. Perubahan warna pada noda ekstrak etanol dan ekstrak etil asetat karena mampu meredam radikal bebas DPPH atau memiliki aktivitas antioksidan. Akan tetapi peredaman warna yang diberikan oleh ekstrak etanol lebih besar dibandingkan pada ekstrak etil asetat. Oleh karena itu penentuan aktivitas antioksidan secara kuantitatif hanya dilakukan pada ekstrak etanol. Untuk membandingkan aktivitas antioksidan digunakan standar quersetin.



Gambar 3.1. Ilustrasi peredaman warna DPPH oleh ekstrak etanol, ekstrak etil asetat dan quersetin

Peredaman warna DPPH terjadi karena adanya senyawa yang dapat memberikan radikal hidrogen kepada radikal DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin). Reaksi reduksi DPPH dapat dilihat berikut ini:



Gambar 3.2. Reduksi DPPH dari senyawa peredam radikal bebas (Prakash *et al*, 2001).

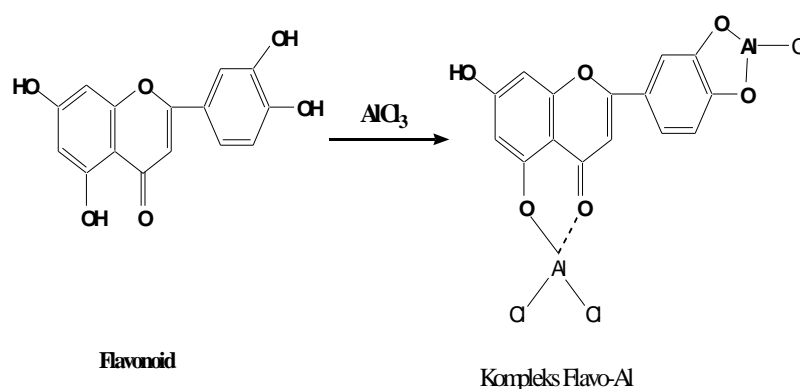
### 3.3. Pemisahan Ekstrak Etanol

Ekstrak etanol dipisahkan dengan kromatografi kolom kemudian dianalisis dengan KLT menghasilkan 13 fraksi besar yaitu fraksi A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M.

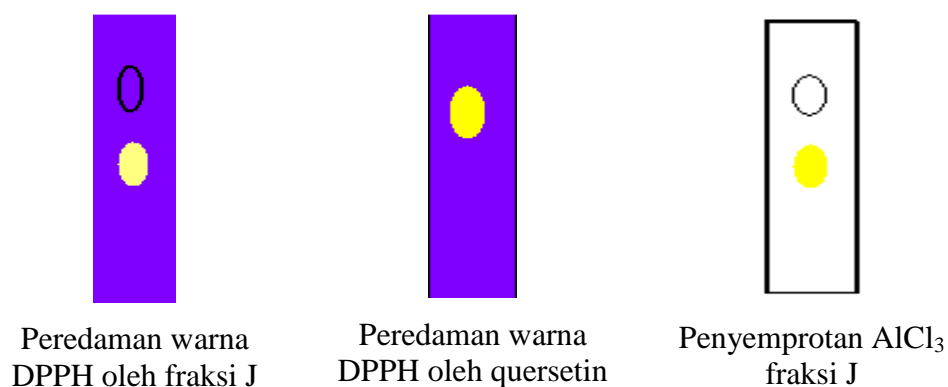
### 3.4. Uji Kualitatif Antioksidan Fraksi Kolom

Penentuan fraksi kolom yang digunakan sebagai uji antioksidan secara kuantitatif terlebih dahulu dilakukan uji antioksidan secara kualitatif. Fraksi yang memberikan peredaman warna DPPH yang paling besar yang diteruskan dengan analisis antioksidan secara kuantitatif. Sebagai pembanding aktivitas antioksidan juga dilakukan pada quersetin.

Hasil KLT menunjukkan bahwa fraksi J memberikan peredaman warna paling besar terhadap warna DPPH yaitu pada noda pertama. Hasil KLT dari fraksi J juga disemprot dengan larutan 5%  $\text{AlCl}_3$  dalam etanol. Noda pertama memberikan perubahan warna menjadi lebih kuning. Perubahan ini disebabkan adanya flavonoid. Reaksi antara  $\text{AlCl}_3$  dengan golongan flavonoid membentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga.



Gambar 3.3 Reaksi kompleks flavonoid-Al



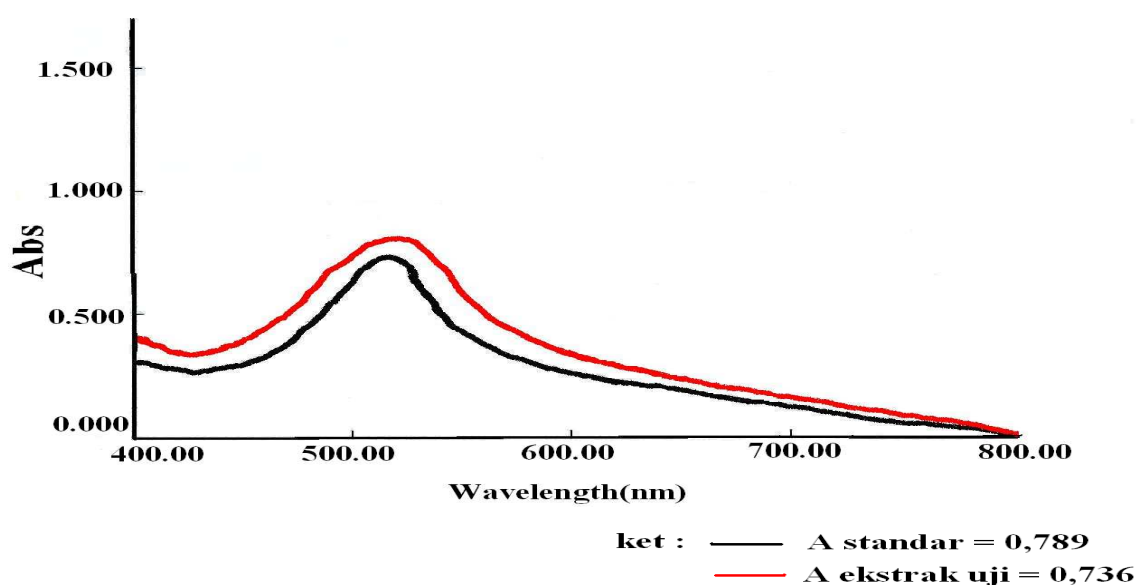
Gambar 3.4. Peredaman warna DPPH oleh fraksi J, quersetin dan penyemprotan  $\text{AlCl}_3$  oleh fraksi J.

Hasil penapisan fitokimia fraksi J mengandung senyawa flavonoid dan alkaloid. Fraksi J kemudian dilanjutkan dengan uji antioksidan secara kuantitatif.

### 3.5. Uji Antioksidan Secara Kuantitatif

#### a. Skrining Panjang Gelombang Maksimal Larutan DPPH 0,05 mM

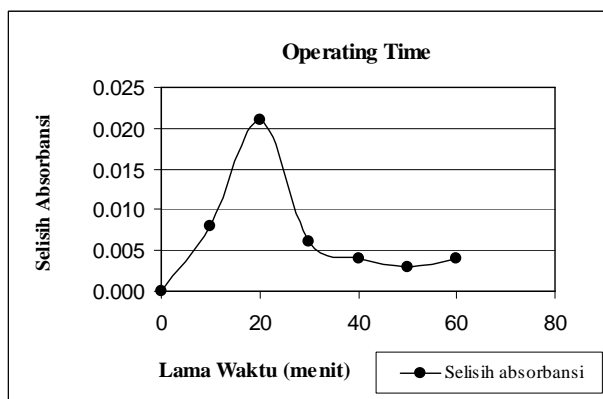
Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak uji yaitu ekstrak etanol dan fraksi J serta standar quersetin diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum ( $\lambda_{maks}$ ) DPPH 0,05 mM dalam etanol sebagai kontrol menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk pengukuran ekstrak uji dan untuk standar quersetin.  $\lambda_{maks}$  yang diperoleh dalam pengukuran untuk ekstrak uji sebesar 515 nm dengan absorbansi sebesar 0,736, sedangkan  $\lambda_{maks}$  yang diperoleh dalam pengukuran untuk standar quersetin sebesar 515 nm dengan absorbansi sebesar 0,789. Adapun spektra larutan DPPH 0,05 mM dalam etanol untuk dapat dilihat pada gambar berikut ini.



Gambar 3.5. (a) Spektra DPPH 0,05 mM dalam etanol untuk ekstrak uji dan standar quersetin

#### b. Operating time Larutan Uji Ekstrak Daun Ketapang

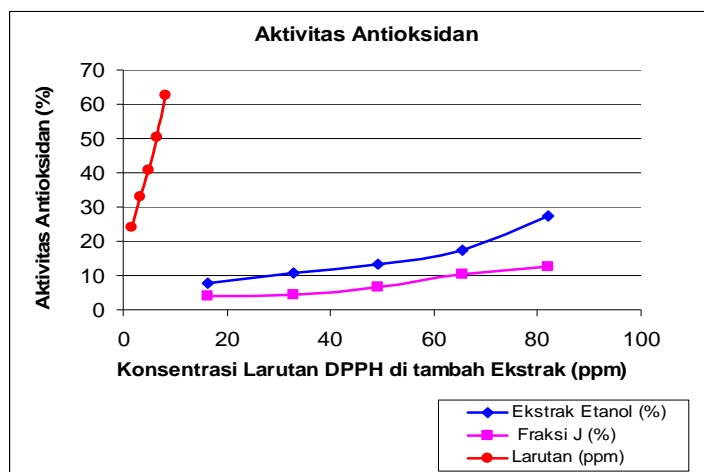
*Operating time* digunakan untuk menentukan waktu paling tepat ekstrak uji dalam meredam radikal bebas DPPH. *Operating time* diperoleh dari selisih pengukuran absorbansi yang paling besar. Dari grafik berikut diketahui bahwa *operating time* pada menit keduapuluh.



Gambar 3.6. Grafik selisih absorbansi pada berbagai variasi waktu.

### c. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol, fraksi J dan quersetin dapat dilihat pada grafik berikut ini.



Gambar 3.7. Grafik aktivitas antioksidan ekstrak etanol, fraksi J dan quersetin

Grafik aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol, fraksi J maupun quersetin menunjukkan dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak maka aktivitas antioksidan juga meningkat. Berikut adalah grafik ekstrak yang diperlukan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas DPPH yang ditunjukkan dengan harga  $IC_{50}$ .

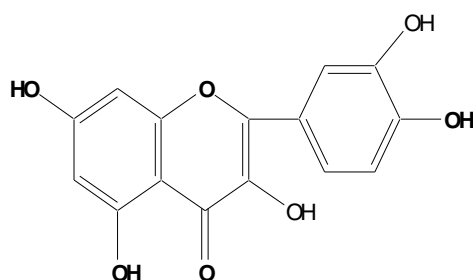
Tabel 3.1. Perbandingan  $IC_{50}$  ekstrak etanol, fraksi J, dan quersetin

Ekstrak	Persamaan Grafik	Nilai $IC_{50}$
Ekstrak Etanol	$y = 0,281 x + 1,5209$ $R^2 = 0,9008$	172,523
Fraksi J	$y = 0,1418 x + 0,692$ $R^2 = 0,9522$	347,726
Quersetin	$y = 5,7839 x + 13,683$ $R^2 = 0,9921$	6,277



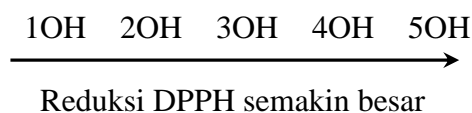
Berdasarkan data di atas terlihat bahwa ekstrak etanol memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih kecil bila dibandingkan dengan fraksi J, akan tetapi ekstrak etanol masih memiliki nilai  $IC_{50}$  yang cukup besar jika dibandingkan dengan quersetin sebagai pembandingnya. Hal ini menunjukkan bahwa untuk meredam warna radikal bebas hingga setengah konsentrasinya pada ekstrak etanol lebih efektif jika dibandingkan dengan fraksi J, tetapi kurang efektif jika dibandingkan dengan quersetin.

Reduksi DPPH menjadi DPPH-H disebabkan adanya donor hidrogen dari senyawa hidroksil baik didalam ekstrak etanol maupun didalam fraksi J. Senyawa-senyawa hidroksil didalam ekstrak etanol akan terpisah menggunakan kromatografi kolom menjadi fraksi-fraksi yang lebih kecil. Oleh karena itu terjadi pengurangan jumlah hidrogen yang dapat didonorkan dari fraksi J pada DPPH. Pada quersetin peredaman warna terjadi lebih efektif jika dibanding ekstrak etanol maupun fraksi J. Hal ini karena di dalam molekul quersetin mempunyai lima gugus hidroksil. Jumlah ini cukup banyak pada setiap molekulnya untuk mereduksi DPPH.



Gambar 3.8 Quersetin

Oleh karena itu dapat diprediksikan bahwa didalam ekstrak etanol maupun fraksi J senyawa yang berperan dalam aktivitas antioksidan adalah golongan flavonoid dengan jumlah gugus hidroksil cukup sedikit. Semakin banyak gugus hidroksil bebas yang dapat menyumbangkan hidrogen maka semakin banyak juga reduksi yang dapat dilakukan terhadap DPPH.



Gambar 3.9 Orientasi besarnya reduksi DPPH oleh gugus hidroksil.

#### IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa didalam ekstrak etanol mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, kuinon, dan fenolik. Sedangkan dalam fraksi J mengandung flavonoid dan alkaloid. IC<sub>50</sub> ekstrak etanol adalah 172,523 ppm sedangkan pada fraksi J 347,729 ppm, sementara senyawa pembanding sebesar 6,277 ppm.

#### V. DAFTAR PUSTAKA

- Boer, Y., 2000, Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Kandis (*Garcinia parvifolia* Miq), *Jurnal Matematika dan IPA 1*, (1) hal 26-33
- Lin, C.C., Hsu J.M., Ujii, T., 1997, Evaluation of Antioxidant and Hepatoprotective activity of *Terminalia catappa*, *Amer J Chin Med*, 27 hal 153-63
- Markham, K.R., 1982, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, a.b. Padmawinata, K., Academic Press, Bandung, hal 47-48
- Panovska, T.K., Kulevanova, S., Stefova., 2005, In Vitro Antioxidant Activity of Some Teucrium Spesies (Lamiaceae), *Acta Pharm*, 55 hal 207-214
- Prakash, A., Rigelhof, F., Miller, E., 2001, *Antioxidant Activity*, Medalliaon Laboratories Analitical Progress, vol 10, No.2
- Pauly, G., 2001, *Cosmetic, Dermatological And Pharmaceutical Use of An Extract Of Terminalia catappa*, United State Patent Application no. 200100022665
- Trilaksani, W., 2003, *Antioksidan: Jenis, Sumber, Mekanisme Kerja dan Peran Terhadap Kesehatan*, Institute Pertanian Bogor, Bogor, hal 1-12