

JURNAL REVIEW

KAJIAN AKTIVITAS ANTI OKSIDAN PADA BAHAN ALAM DENGAN MENGGUNAKAN 1,1-DIFENIL-2- PIKRILHIDRAZIL (DPPH)

Syukri Arief¹, Risma Sari^{2*}, Novesar Jamarun³, Sumaryati Syukur⁴

^{1,3,4} Jurusan Kimia, Universitas Andalas,
Jl. Universitas Andalas, Limau Manis, Kec. Pauh, Padang 25163, Indonesia

^{2*}Program Studi Analisis Kimia, Politeknik ATI Padang,
Bungo Pasang-Tabing, Padang 25171 Indonesia

*email : rismasari171@gmail.com

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi anti oksidan yang terdapat pada bahan alam. Uji aktivitas antioksidan ini dilakukan pada beberapa bahan alam atau tumbuhan umum yang telah dikenal dan digunakan secara turun temurun oleh masyarakat Indonesia. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metoda DPPH menggunakan parameter IC50 dan sampel bahan alam yang digunakan adalah virgin coconut oil (VCO) dari tanaman kelapa, Daun Tanjung dan ekstrak daun salam. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa sampel bahan alam yang digunakan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat, didapatkan nilai IC50 berada diantara 50-100 ppm

Kata kunci: Antioksidan, DPPH, IC50, VCO, Ekstrak Daun Salam, Daun Tanjung

STUDY OF ANTI-OXIDANT ACTIVITY TEST ON NATURAL MATERIALS USING 1,1-DIFENYL-2-PIKRILHIDRAZIL (DPPH)

Abstract

This study aims to determine the anti-oxidant potential found in natural materials. The antioxidant activity test was carried out on several natural ingredients or common plants that have been known and used for generations by the people of Indonesia. Antioxidant activity testing was carried out using DPPH method using IC50 parameters and natural material samples used were virgin coconut oil from coconut plants, Tanjung leaves and bay leaves. Antioxidant activity test showed that the sample of natural materials used had strong antioxidant activity, it was found that IC50 values were between 50-100 ppm.

Keywords: Antioxidant, DPPH, IC50, VCO, Extract Bay Leave, *Mimusops elengi* L

PENDAHULUAN

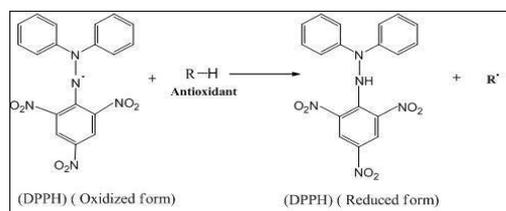
Masyarakat Indonesia rentan terserang radikal bebas yang menyebabkan stress oksidatif, hal ini dikarenakan Indonesia sebagai daerah tropis dengan intensitas paparan sinar matahari yang tinggi dan tingkat polusi kendaraan bermotor dan rokok. Radikal bebas merupakan senyawa yang berperan aktif dalam proses pengrusakan integritas sel dalam tubuh. Radikal bebas ini dapat menimbulkan berbagai penyakit metabolit, kardiovaskular dan proses penuaan pada kulit (ageing). (Maslachah, L, dkk, 2008)

Radikal bebas bersifat tidak stabil dan sangat reaktif yakni cenderung bereaksi dengan molekul lainnya untuk mencapai kestabilan. Radikal dengan kereaktifan yang tinggi ini dapat memulai sebuah reaksi berantai dalam sekali pembentukannya sehingga menimbulkan senyawa yang tidak normal dan memulai reaksi berantai yang dapat merusak sel-sel penting dalam tubuh. Radikal bebas dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan.

Oleh karena itu penggunaan antioksidan saat ini merupakan hal yang penting agar terhindar dari berbagai penyakit, Industri obat dan kosmetik di Indonesia berlomba-lomba menciptakan antioksidan, Antioksidan sintetik seperti ter-butilhidroksi anisol (BHA), ter-butilhidroksi toluen (BHT), propil galat (PG), dan ter-butil hidrokuinon (TBHQ) yang selama ini digunakan dapat meningkatkan antioksidan sintetik ini (Farhoosh, R., 2009). Antioksidan sintetik seperti BHA (butylated hidroxy aniline) dan BHT (butylated hidroxy toluen) telah diketahui memiliki efek samping yang besar antara lain menyebabkan kerusakan hati dan kerusakan DNA (Maslachah, L, dkk, 2008; Wangenstein, H., 2004; Kikuzaki, H., 2002) Di sisi lain alam menyediakan sumber antioksidan yang efektif dan relatif aman seperti flavonoid, vitamin C, beta karoten dan lain-lain. Hal tersebut mendorong semakin banyak dilakukan eksplorasi bahan alam sebagai sumber antioksidan.

Karena alasan ini, maka pencarian antioksidan yang berasal dari bahan alami seperti tanaman, sayuran,

dan buah-buahan menjadi sangat penting dilakukan. Menurut Molyneux (2004), antioksidan bereaksi dengan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) yang menstabilkan radikal bebas dan mereduksi DPPH. Kemudian DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen dari senyawa peredam radikal bebas membentuk 1,1-difenil-2-pikrilhidrazin (DPPH-H) yang lebih stabil. Reagen DPPH yang bereaksi dengan antioksidan akan mengalami perubahan warna dari ungu ke kuning, intensitas warna tergantung kemampuan dari antioksidan. Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC₅₀ yang diperoleh. Jika nilai IC₅₀ suatu ekstrak berada dibawah 50 ppm maka aktivitas antioksidannya kategori sangat kuat, nilai IC₅₀ berada diantara 50-100 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori kuat, nilai IC₅₀ berada di antara 100-150 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori sedang, nilai IC₅₀ berada di antara 150-200 ppm berarti aktivitas antioksidannya kategori lemah, sedangkan apabila nilai IC₅₀ berada diatas 200 ppm maka aktivitas antioksidannya dikategorikan sangat lemah (Arianti, dkk, 2007).



Gambar 1. Reaksi DPPH dengan senyawa antioksidan
(Sumber : pubs.rsc.org)

METODOLOGI PENELITIAN

Metode ekstraksi VCO

Pertama kelapa diparut dan diambil santannya, kemudian santan didiamkan selama 30 menit. Santan kental yang diperoleh selanjutnya dibagi dua masing-masing sebanyak 325 mL. VCO diperoleh dengan cara santan kental dipanaskan pada 130 oC selama 30 menit (VCOP) dan difermentasi menggunakan fermipan (ragi yang telah dikomersilkan) 10% selama semalam (VCOF). Sampel VCOP dan VCOF masing-masing

diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH dan antibakteri menggunakan metode sumuran. Selanjutnya pada kedua sampel tersebut diekstrak kandungan total fenoliknya menggunakan methanol dan uji aktivitas antioksidannya (Maria Ludya Pulung, dkk., 2016).

Uji aktivitas antioksidan Penentuan kandungan total fenolik pada VCOP dan VCOF

Ke dalam tabung reaksi dimasukkan 1 mL larutan sampel dan ditambah 1 mL Na₂CO₃ jenuh dibiarkan 10 menit pada suhu kamar, selanjutnya ditambah 0,5 mL reagen folin-ciocalteu (1:1) dan 7,5 mL aquades, digojog dan dibiarkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada 750 nm, konsentrasi fenolat sampel dihitung berdasarkan kurva standar yang diperoleh dari fenol murni.

Ekstrak komponen polifenol pada VCOP dan VCOF

Sebanyak 20 gram sampel diekstrak dengan 50 mL methanol, campuran diaduk selama 1 jam pada suhu ruang, dibekukan selama 1 minggu untuk memisahkan antara fraksi polar dengan lipid pemisahan dilakukan secara manual, fraksi polar yang mengandung polifenol adalah yang diperoleh selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya menggunakan metode DPPH.

Pengujian aktivitas antioksidan pada VCOP, VCOF, polifenol VCOP (PVCOP) dan polifenol VCOF (PVCOF)

Aktivitas antioksidan pada VCOF, VCOP, PVCOP dan PVCOF polifenol ditentukan dengan menggunakan metode DPPH. Pada sampel dibuat seri konsentrasi masing-masing 60; 70; 80; 90 dan 100 µg/mL lalu ditambahkan DPPH 90 µM dalam 95% methanol, dibiarkan pada suhu ruang dan gelap selama 30 menit dan dihitung absorbansi pada 515 nm, dilakukan juga pada kontrol positif (BHT). Data absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk

menghitung persentase penangkalan (scavenging) radikal bebas DPPH.

Ekstraksi daun salam dengan menggunakan pelarut etanol absolut

Ekstrak daun salam dibuat dengan mengekstraksi 30 gram serbuk masing-masing daun salam (daun muda, daun setengah tua daun tua) secara maserasi dengan pelarut etanol hingga terekstraksi sempurna. Simplisia direndam dalam pelarut etanol absolute sebanyak 300 mL selama 2 x 24 jam. Setelah 2 x 24 jam filtrat yang diperoleh disaring dan residunya dimaserasi kembali dengan pelarut etanol. Hasil ekstraksi selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan rotary vacuum evaporator.

Identifikasi senyawa bioaktif daun salam

Uji alkaloid: 0,1 gram ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol absolut, kemudian ditambahkan dengan Reagen Mayer setetes demi setetes. Terbentuknya endapan yang berwarna merah sebagai indikator reaksi positif adanya alkaloid.

Uji flavonoid: 0,1 gram ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol absolut kemudian ditambahkan lagi dengan 0,1 gram logam Mg. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan reaksi positif adanya flavonoid.

Uji saponin: 0,1 gram ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL aquades panas lalu didinginkan. Setelah itu campuran dikocok sampai muncul buih dan didiamkan selama 2 menit. Selanjutnya campuran ditambahkan dengan 2 tetes HCl 2 N dan dikocok lagi sampai terbentuk buih yang mantap selama 10 menit. Terbentuknya buih tersebut sebagai indikator reaksi positif adanya saponin.

Uji tanin: 0,1 gram ekstrak daun salam ditambahkan dengan 5 mL etanol absolut kemudian ditetesi dengan FeCl₃ 1%. Terbentuk warna biru tua menunjukkan reaksi positif adanya tanin.

Uji aktivitas antioksidan daun salam

Larutan induk ekstrak daun salam 1000 ppm dan larutan pembanding vitamin C 1000 ppm dipipet masing-masing 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, dan 2 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, lalu ditambahkan 5 mL larutan DPPH 0,5 mM lalu volumenya dicukupkan dengan etanol absolut sampai garis tanda. Kemudian dibiarkan selama 30 lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Sebagai blanko, diukur 5 mL larutan DPPH kemudian dicukupkan volumenya hingga 25 mL dalam labu ukur kemudian diukur absorbansinya.

Pembuatan Ekstrak Daun Tanjung.

Sebanyak 4,25 gram serbuk simplisia di ekstraksi dengan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Simplisia di letakkan didalam gelas beaker kemudian ditambahkan 200 ml etanol untuk melarutkan simplisia. Kemudian larutan tersebut di masukkan kedalam labu leher tiga pada alat refluks yang telah dihubungkan dengan kondensor. Kemudian simplisia dipanaskan pada suhu 50°C dengan waktu pengambilan sampel adalah 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit dan 75 menit.

Pengujian Antioksidan ekstrak daun tanjung

Menyiapkan 5 sampel ekstrak daun tanjung yang memiliki variasi waktu ekstraksi yaitu 15 menit, 30 menit, 45 menit, 60 menit, 75 menit. Kemudian membuat larutan induk masing-masing sampel sebesar 100 ppm dengan melarutkan 10 mg ekstrak pada 100 ml metanol PA. Selanjutnya melakukan pengenceran menggunakan pelarut metanol PA dengan membuat variasi konsentrasi yaitu 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8 ppm dan 9 ppm pada tiap masing-masing sampel. Menyiapkan larutan stock DPPH 50 ppm. Larutan stock DPPH dibuat dengan melarutkan 5 mg padatan DPPH ke dalam 100 ml metanol PA. Kemudian disiapkan larutan perbandingan, yaitu larutan kontrol yang berisi 2 ml metanol

PA dan 1 ml larutan DPPH 50 ppm. Untuk sampel uji, disiapkan masing-masing 2 ml larutan sampel dan 2 ml larutan DPPH. Kemudian, di inkubasi selama 30 menit pada suhu 27°C hingga terjadi perubahan warna dari aktivitas DPPH. Semua sampel dibuat triplo. Semua sampel yaitu sampel ekstrak yang telah di inkubasi di uji nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-vis pada panjang gelombang 517 nm.

Analisis pengujian antioksidan metode DPPH dilakukan dengan melihat perubahan warna masing-masing sampel setelah di inkubasi bersama DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak maka akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari ungu tua hingga kuning terang. Kemudian sampel diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Penentuan IC50

Uji antioksidan dalam penelitian ini menggunakan parameter IC50 (inhibition concentration) untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode uji menggunakan DPPH. IC50 merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan penghambatan 50% radikal bebas oleh suatu konsentrasi sampel (ppm) (Mailandari, M, 2012). Semakin kecil nilai IC50 berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dapat digolongkan berdasarkan nilai IC50 yang diperoleh. Jika nilai IC50 suatu ekstrak berada dibawah 50 ppm maka aktivitas antioksidannya sangat kuat, nilai IC50 berada diantara 50-100 ppm berarti aktivitas antioksidannya kuat, nilai IC50 berada di antara 100-150 ppm berarti aktivitas antioksidannya. Nilai IC50 dihitung dengan persamaan regresi linear.

Tabel 1. Sifat antioksidan berdasarkan nilai IC50

No	Nilai IC50	Sifat Antioksidan
1	50 ppm<	Sangat kuat
2	50ppm-100 ppm	Kuat
3	100ppm-150ppm	sedang
4	150ppm-200ppm	lemah

(sumber : molyneux,2004)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data Hasil Uji Aktivitas Antioksidan yang telah diperoleh disajikan pada tabel berikut :

Tabel 2. Hasil uji antioksidan Pada sampel VCO

No	Sampel	IC ₅₀ (ppm)
1	VCOF	20,79
2	VCOP	17,17
3	Polifenol VCOF	27,07
4	Polifenol VCOP	22,14

Tabel 2 menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antioksidan antara VCOF, VCOP, Polifenol VCOF dan Polifenol VCOP. Dari data memperlihatkan bahwa VCOF dan VCOP memiliki aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan antioksidan sintetik Hal ini disebabkan karena dalam VCOF dan VCOP terdapat 2 senyawa akseptor yang bertindak dalam menangkap radikal DPPH yakni komponen senyawa fenolik dan vitamin E. ekstrak polifenol VCOP (PVCO) memiliki aktivitas yang sedikit lebih rendah dibandingkan antioksidan BHT. Namun perbedaan tersebut tidaklah signifikan (Maria Ludya Pulung, dkk., 2016).

Tabel 3. Hasil Uji Antioksidan pada Sampel ekstrak Daun Tanjung dengan variasi waktu ekstraksi

No	Waktu ekstraksi (menit)	IC ₅₀ (ppm)
1	15	14,47
2	30	13,16
3	45	10,6
4	60	15,775
5	75	23,27

Perbedaan nilai IC50 ini dapat disebabkan oleh jumlah antioksidan yang terkandung didalam ekstrak. Pada variasi waktu 60 menit dan 75 menit terjadi penurunan nilai IC50. Hal ini terjadi akibat kerusakan antioksidan didalam ekstrak yang dipengaruhi oleh lamanya waktu kontak antara zat aktif dengan pelarut yang suhunya semakin meningkat akibat pemanasan yang lama (Dewi Tristantini, 2016).

Tabel 4. Hasil Uji Antioksidan Pada ekstrak daun salam

No	Sampel	IC ₅₀ (ppm)
1	daun salam muda	37,441
2	Daun salam setengah tua	14,889
3	Daun salam tua	11,001

Data absorbansi yang diperoleh di atas menunjukkan bahwa semakin tua umur daun, maka semakin kecil nilai absorbansinya. Penurunan absorbansi pada umur daun yang berbeda disebabkan oleh perbedaan kandungan senyawa antioksidan, dimana semakin tua umur daun maka semakin banyak senyawa antioksidan yang terkandung di dalamnya (Arianti, dkk, 2007). Semakin banyaknya senyawa antioksidan akan menyebabkan semakin besar pula peredaman warna ungu dari DPPH sehingga nilai absorbansi yang diperoleh semakin kecil.

KESIMPULAN

Pemanfaatan bahan alam sebagai pengganti antioksidan sintetik sangat penting untuk dipertimbangkan, pada VCOP lebih potensial sebagai antioksidan alami dibandingkan dengan VCOF, tetapi sebaiknya juga dilakukan variasi waktu dan suhu pemanasan diatas 100o C sehingga di peroleh data yang lebih baik. Ekstrak daun Mimusops elengi Lyang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi atau bernilai IC50 terendah adalah daun Mimusops elengi Lyang di ekstraksi dengan variasi waktu 45 menit yaitu sebesar 10,6. Waktu pemanasan yang lama dapat merusak antioksidan didalam ekstrak karena adanya pengaruh lama waktu kontak antara zat aktif dengan pelarut yang suhunya semakin meningkat akibat pemanasan yang lama. Ekstrak Daun salam tua memiliki daya antioksidan yang sangat kuat Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa makin tua umur tanaman makin terakumulasi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Peningkatan senyawa bioaktif ini disebabkan proses sintesis senyawa bioaktif yang meningkat apabila tanaman terkena cahaya langsung

DAFTAR PUSTAKA

- Antioxidant activity of crude tannins of canola and Rapeseed Hulls, *Journal of the American Oil Chemists Society*.2000;77(9), 957- 961.
- Arianti, Harsojo, Syafria, Y., & Ermayanti, T.M. Isolasi dan uji antibakteri batang sambung nyawa (*gynura procumbens* Lour) umur panen 1, 4 dan 7 bulan. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*,2007; 6(2), 43-45.
- Dewi Tristantini¹, Alifah Ismawati, Bhayangkara Tegar Pradana, Jason Gabriel. Jonathan. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (Mimusops elengi L), Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia “Kejuangan” Pengembangan Teknologi Kimia untuk Pengolahan Sumber Daya

Alam Indonesia Yogyakarta, 17 Maret 2016

- Enig M G., *The Health Benefits of Coconuts & Coconut Oil*,2007 www.nexusmagazine.com.
- Farhoosh, R., Antioxidant activity and mechanism of action of buteinin linoleic acid. *Food Chemistry*.2005;93, 633-699.
- Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Hirose, K., Akiyama, K., & Taniguchi, H. Antioxidants properties of ferulic acid and it's related compound. *Journal of Agricultural Food Chemistry*,2002; 50(7), 2161-2168.
- Lim, F.P.K., Bongosia, L.F.G., Yao, N.B.N. & Santiago, L.A. Cytotoxic Activity of the Phenolic Extract of Virgin Coconut Oil on Human Hepatocarcinoma Cells (HepG2). *International Food Research Journal*. 2014;21(2), 729-733
- Mailandari, M. (2012). Uji aktivitas antioksidan ekstrak daun garcinia kydia roxb. dengan metode DPPH dan identifikasi senyawa kimia fraksi yang aktif. Depok:Universitas Indonesia.
- Maria Ludya Pulung, Radite Yogaswara, Fajar Ria D.N.Sianipar.Potensi Antioksidan dan Anti bakteri virgin coconut oil dari tanaman kelapa asal papua.*Chem. Prog. November 2016, Vol. 9. No. 2*
- Maslachah, L, Sugihartuti, R., & Kurniasanti, R. Hambatan Produksi Reactive Oxygen Species Radikal Superoksida (O₂⁻) oleh Antioksidan Vitamin E (alpha-tokopherol) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Menerima Stressor Renjatan Listrik, Media Kedokteran Hewan, Januari 2008, Vol, 24, No 1.

- Molyneux,P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal of Science Technology*, 2004; 26(2), 211-219.
- Putrawan Bahrul, Nurdin Rahman dan Anang WahidM.Diah, Antioxidant Activity Test of Bay Leave (*Syzygium polyanthum*) Extract Using 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazyl, *J. Akad. Kim.* August 2014; (3), 143-149.
- Sari N. The effect of virgin coconut oil (VCO) on the profile of immunohistochemical antioxidant superoxide dismutase (SOD) in the kidney of diabetic rat. Thesis.Fakultas Kedokteran Hewan. Institut Pertanian Bogor 2009.
- Wangensteen, H., Samuelsen, A. B., & Malterud,K.E. Antioxidant activity in extracts from Coriander, *Food Chemistry*.2004; 88(2),293-297.