

## Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pala (*Horsfieldia Spicata*) Menggunakan Metode DPPH

Susanty<sup>1\*</sup>, Ika Kurniaty<sup>2</sup>, Fatmasari<sup>3</sup>, Ayuningtias Asmara Suci<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Jurusan Teknik Kimia, Falkutas Teknik, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jl. Cempaka Putih Tengah 27 Jakarta Pusat 10510

<sup>2</sup> Jurusan Teknik Kimia, Falkutas Teknik, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jl. Cempaka Putih Tengah 27 Jakarta Pusat 10510

<sup>3</sup> Jurusan Teknik Kimia, Falkutas Teknik, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jl. Cempaka Putih Tengah 27 Jakarta Pusat 10510

<sup>4</sup> Jurusan Teknik Kimia, Falkutas Teknik, Universitas Muhammadiyah Jakarta, Jl. Cempaka Putih Tengah 27 Jakarta Pusat 10510

\*susanty@umj.ac.id

### ABSTRAK

Beras merah (*Oryza rufipogon*) memiliki kandungan yaitu senyawa antosianin yang dapat digunakan sebagai penanda titik akhir titrasi asam basa. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar antosianin dalam beras merah, dan mencari pengaruh perbandingan fraksi pelarut etanol:metanol terhadap kadar antosianin. Penelitian dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi dengan perbandingan fraksi pelarut etanol:methanol yaitu 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, dan 3:1 pada suhu ruang selama 2x24 jam. Hasil ekstraksi kemudian disaring dan dipekatkan dengan rotary vakum evaporator. Hasil penelitian menunjukkan pada uji fitokimia beras merah positif mengandung senyawa flavonoid, kunionon dan tannin, begitu juga dengan uji FTIR gugus fungsi yang terdapat pada beras merah sama dengan standar antosianin yaitu gugus fungsional O-H, C=O dan C=C. Hasil Rendemen optimum pada konsentrasi fraksi pelarut 1:2 yaitu 2%. Hasil ekstraksi antosianin pada beras merah selanjutnya di analisa menggunakan spektrofotometer UV- Vis dan dibandingkan dengan pемbanding billberry ekstrak dimana dalam standar tersebut telah diketahui pasti kandungan antosianin. Hasil kadar antosianin terbaik didapat pada perbandingan fraksi pelarut 3:1 yaitu 0,3917 mg/mL dengan persamaan  $y = 0.05x + 0.0871$  dengan  $R^2 = 0.5127$ .

**Kata kunci:** antosianin, beras merah, maserasi, rasio fraksi pelarut

### ABSTRACT

*Brown rice (Oryza rufipogon) contains anthocyanin compounds which can be used as end point markers for acid-base titrations. This study aims to determine the levels of anthocyanins in brown rice, and to investigate the effect of the ratio of the ethanol:methanol solvent fraction on anthocyanin levels. The research was conducted by maceration extraction method with ratios of ethanol:methanol solvent fractions namely 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, and 3:1 at room temperature for 2x24 hours. The extraction results were then filtered and concentrated using a rotary vacuum evaporator. The results showed that the phytochemical test positive for brown rice contained flavonoids, kunionone and tannins, as well as the FTIR test, the functional groups found in brown rice were the same as the standard anthocyanins, namely the functional groups O-H, C=O and C=C. The optimum yield yield at a concentration of 1:2 solvent fraction is 2%. The results of anthocyanin extraction in brown rice were then analyzed using a UV-Vis spectrophotometer and compared with a comparator of billberry extract in which the anthocyanin content was known with certainty. The best anthocyanin content results were obtained at a solvent fraction ratio of 3:1, namely 0.3917 mg/mL with the equation  $y = 0.05x + 0.0871$  with  $R^2 = 0.5127$ .*

**Keywords:** anthocyanins, brown rice, maceration, solvent fraction ratio

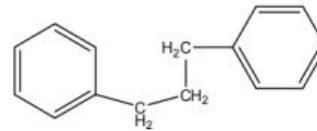
## PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan molekul yang mampu memperlambat atau mencegah oksidasi molekul lain menghasilkan radikal bebas. Antioksidan menghentikan reaksi berantai ini dengan menghilangkan intermediet radikal dan menghambat reaksi oksidasi lainnya dengan mengoksidasi dirinya sendiri. Antioksidan mampu menghambat proses oksidasi, bahkan pada konsentrasi yang relatif kecil dan memiliki peran fisiologis yang beragam di dalam tubuh. Kandungan antioksidan dari tumbuhan bertindak sebagai penangkap radikal, yang dapat mengubah radikal menjadi spesies yang kurang reaktif. Antioksidan memiliki keunggulan karena tidak memiliki efek samping, lebih murah dan melimpah di berbagai jenis tanaman. Sejumlah besar tanaman obat telah diteliti antioksidannya dan dianggap mampu mencegah proses destruktif yang disebabkan oleh stress oksidatif. Tanaman yang memiliki potensi untuk mencegah terpapar oleh radikal bebas serta masalah kesehatan lainnya yaitu rempah-rempah.

Pala (*Horsfieldia spicata*) merupakan salah satu rempah-rempah yang diminati di Indonesia. Daun tanaman pala menjadi salah satu alternatif dari beberapa bagian tanaman pala yang masih belum dimanfaatkan. Kandungan yang dimiliki pada daun tanaman pala yaitu senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid dan tanin (Ginting, Barus, Marpaung, & Simanjutak, 2014). Flavonoid yang terdapat dalam daun tanaman pala merupakan senyawa alami yang masih jarang dimanfaatkan, meskipun memiliki potensi untuk mengobati berbagai penyakit, termasuk kanker dikarenakan senyawa ini memiliki kemampuan antioksidan yang dapat melindungi sel dari kerusakan akibat radikal bebas. Selain itu, pala juga digunakan dalam pengobatan sebagai karminatif, astringent, narkotika, afrodisiak, perut kembung, mual dan muntah. Biji pala mengandung senyawa

aktif miristisin narkotika (Krishnamoorthy dkk., 2003).

Flavonoid merupakan kelompok polifenol dan diklasifikasikan berdasarkan struktur kimia serta biosintesisnya (Seleem et al., 2017).



**Gambar 1.** Struktur Dasar Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa kimia turunan dari 2-phenyl-benzyl-γ-pyrone dengan biosintesis menggunakan jalur fenilpropanoid. Flavonoid memiliki sifat yang mudah teroksidasi pada suhu tinggi dan tidak tahan panas.

Flavonoid yang terkandung dalam tanaman memiliki berbagai macam manfaat seperti sebagai antioksidan, anti inflamasi, antibakteri dan antijamur dengan mekanisme masing-masing. Sebagai antioksidan, flavonoid berperan untuk menetralkan radikal bebas dengan cara memberikan satu atom hidrogen kepada senyawa yang bersifat oksidan sehingga menjadi stabil. Flavonoid sebagai anti inflamasi dengan cara menghambat aktivitas enzim COX dan lipooksigenase secara langsung yang menyebabkan penghambatan biosintesis prostaglandin serta leukotrien yang merupakan produk akhir dari jalur COX dan lipooksigenase. Flavonoid sebagai antibakteri mampu menghambat DNA girase pada bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Flavonoid sebagai anti jamur bekerja dengan cara melisis dinding sel jamur sehingga senyawa fenol yang terkandung dalam flavonoid tersebut dapat merusak inti sel dan demikian pertumbuhan jamur akan terhambat.

Komponen flavonoid yang terdapat pada daun pala menunjukkan keberadaan senyawa fenolik, sehingga perlu untuk dilakukan penelitian mengenai kandungan fenolik total pada ekstrak daun pala. Komponen fenolik ini penting mengingat peranannya yang besar dalam pengobatan dan pencegahan timbulnya penyakit termasuk sebagai antioksidan.

## METODOLOGI PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu gelas kimia, gelas ukur, tabung reaksi, pipet tetes, corong, labu ukur, neraca analitik, kertas saring, pH meter, rotary evaporator, oven, spektrofotometer UV-VIS, .

Bahan-bahan yang digunakan daun pala, larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98%, *aquadest*, HCl, asam askorbat, etanol p.a, larutan CH<sub>3</sub>COOH, etanol teknis 96%, kloroform, DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazylhydrate), MgSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>, metanol, NaCl, pereaksi mayer, kertas saring, aluminium foil.

### Metode Penelitian

#### 1. Persiapan bahan baku.

Daun pala dicuci hingga bersih. Kemudian dijemur di bawah sinar matahari selama 1 hari. Daun pala yang sudah kering dihaluskan menggunakan blender dan ditimbang. Lalu disimpan dalam wadah tertutup.

#### 2. Proses ekstraksi.

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% selama 3 hari, kemudian difiltrasi. Proses penyaringan dilakukan sebanyak 2x dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama.

#### 3. Proses Evaporasi.

Hasil ekstrak lalu dievaporasi dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 80°C selama 1,5 jam. Kemudian filtrat ekstrak daun pala ditimbang.

#### 4. Perhitungan rendemen.

Persen rendemen diperoleh dengan membandingkan berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat simplisia sebagai bahan baku. Semakin tinggi nilai rendemen menunjukkan bahwa ekstrak yang dihasilkan semakin besar.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Bobot Ekstrak}}{\text{Bobot Simplisia}} \times 100\%$$

#### 5. Pengujian Fitokimia.

##### 1. Uji Fenolik.

Sampel ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. ditandai dengan munculnya warna hijau, merah, ungu atau hitam.

##### 2. Uji Flavonoid.

Sampel ditambahkan beberapa tetes HCl pekat dan 1,5 g logam magnesium, ditandai dari terbentuknya warna pink atau merah magenta dalam waktu 3 menit.

##### 3. Uji Saponin.

Sampel 2 g sampel dilarutkan dalam 20 ml *aquadest* kemudian dididihkan dan dikocok hingga terbentuk busa, ditandai dengan terbentuknya busa yang stabil.

##### 4. Uji Steroid.

0,5 g sampel ekstrak ditambahkan dengan asam asetat anhidrat 3 ml, kemudian ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat, ditandai dengan perubahan warna dari violet menjadi biru atau hijau.

##### 5. Uji Terpenoid.

Sampel sebanyak 5 ml ditambahkan dengan 2 ml kloroform, lalu ditambahkan 3 ml asam sulfat. Terbentuknya warna coklat kemerahan pada permukaan dalam larutan, menunjukkan adanya terpenoid.

##### 6. Uji Alkaloid.

20 g sampel ekstrak ditambahkan 5 ml HCl 2 M, kemudian diaduk dan dipanaskan. Setelah itu ditambahkan dengan 0,5 g NaCl kemudian diaduk dan disaring, setelah itu ditambahkan HCl 0,2 M untuk membilas filter. Selanjutnya filtrate dipekatkan dan ditabung diberikan pereaksi Mayer serta diamati kekeruhan dan endapan yang terjadi.

### Prosedur Analisa Sampel

Uji Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH)

#### 1. Pembuatan larutan induk

- Sampel ditimbang sebanyak 25 mg.
- Kemudian ditambahkan metanol 96% dalam labu ukur 25 mL sampai tanda batas kemudian dihomogenkan.

## 2. Pembuatan Larutan DPPH

- DPPH ditimbang sebanyak 3,9 mg.
- Kemudian ditambahkan metanol dalam labu 25 ml sampai tanda batas.
- Diperoleh larutan DPPH 0,4 mM.

## 3. Pembuatan larutan standar Asam Askorbat

- Asam Askorbat ditimbang sebanyak 5,0 mg ke dalam labu 100 mL.
- Kemudian ditambahkan larutan metanol sampai tanda batas.
- Pipet larutan Asam Askorbat sebanyak 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml; 2,5 ml pada labu 10 ml
- Metanol ditambahkan sampai tanda batas.
- Absorbansi dari masing-masing larutan standar diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-VIS

## 4. Sampel ekstrak daun pala

- Larutan induk di pipet ke dalam tabung reaksi.
- Di pipet sebanyak 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml; dan 5,0 ml dimasukkan ke dalam labu 10 mL.
- Kemudian ditambahkan larutan DPPH dan metanol sampai tanda batas.
- Absorbansi dari masing-masing sampel diperoleh menggunakan spektrofotometer UV-VIS

## Metode Analisa Data

Analisa aktivitas antioksidan merupakan metode analisa kuantitatif untuk menentukan nilai IC-50 yang dihasilkan dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Perhitungan yang digunakan adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs Kontrol} - \text{Abs sampel uji}}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

Perhitungan Nilai IC<sub>50</sub>:

$$y = ax + b$$

$$50 = ax + b$$

$$IC - 50 = \frac{50 - a}{b}$$

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian yang dilakukan, daun pala dibersihkan dan dirajang kemudian diekstraksi dengan metode maserasi. Metode ini digunakan karena metode ini merupakan metode dingin sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya zat aktif akibat pemanasan selain itu metode ini memiliki kelebihan yaitu cara pengerjaan dan alat yang digunakan sederhana.

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi yaitu etanol 96% karena flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam pelarut polar seperti etanol. Ekstrak cair setelah dipekatkan diperoleh ekstrak kental sebanyak 14,7196 gram dengan persentase rendamen sebesar 24%. Hasil ekstraksi kemudian dilakukan pengujian fitokimia dan didapatkan hasil pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hasil identifikasi kandungan ekstrak daun pala

Golongan senyawa	Hasil	Literatur
Fenolik	+	Ditandai dengan munculnya warna hijau, merah, ungu atau hitam.
Alkaloid	+	Ditandai dengan kekeruhan dan endapan putih
Saponin	+	Terbentuknya busa yang stabil setelah didiamkan
Flavonoid	+	Terbentuknya warna pink atau merah magenta
Steroid	+	Ditandai dengan perubahan warna dari violet menjadi biru atau hijau

Pada uji fitokimia diketahui bahwa ekstrak daun pala positif mengandung flavonoid jika ditandai dengan terbentuknya warna jingga, kuning atau merah pada lapisan amil alkohol.

Pengukuran aktivitas antioksidan sampel dilakukan pada panjang gelombang 516 nm yang merupakan panjang gelombang maksimum DPPH. Adanya aktivitas antioksidan dari sampel mengakibatkan terjadinya perubahan warna pada larutan DPPH dalam metanol yang semula berwarna ungu pekat menjadi kuning pucat (Molyneux, 2004). Tiap konsentrasi yang diperoleh kemudian diukur pada spektrofotometer UV-Vis

dengan asam askorbat murni sebagai pembanding (standar). Hasil uji antioksidan ekstrak daun pala dan asam askorbat diperlihatkan pada Tabel 2 dan Tabel 3 berikut ini:

**Tabel 2.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Pala

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Blanko	Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
100		1.5803	22.0	223.63
200		0.9957	50.8	
300	2.02691	0.6045	70.1	
400		0.3581	82.3	
500		0.3312	83.6	

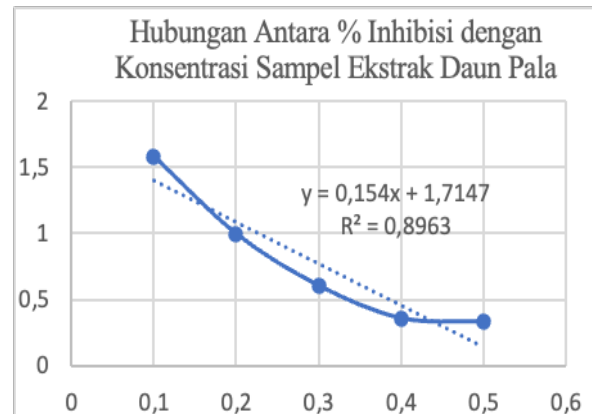
**Tabel 3.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Asam Askorbat

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Blanko	Absorbansi	% Inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
5		1.4177	30.0	14.91
10		0.6483	68.0	
15	2.02691	0.0632	96.8	
20		0.0611	96.9	
25		0.0610	96.9	

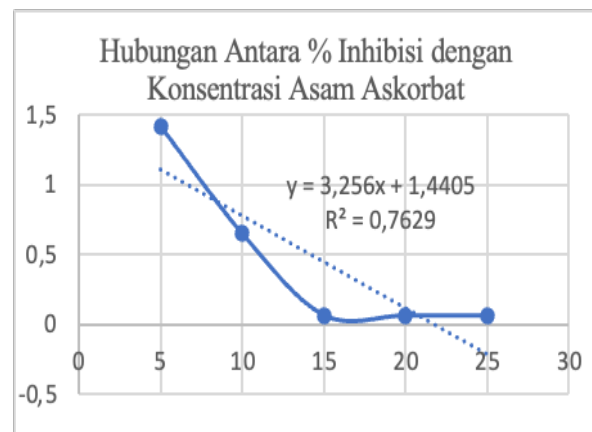
Tabel 2 dan 3 memperlihatkan bahwa semakin besar konsentrasi semakin kecil absorbansinya karena semakin besar konsentrasi larutan, aktivitas antioksidan semakin tinggi. Hal ini ditandai dengan semakin pudarnya warna DPPH dan semakin besarnya nilai % inhibisi (hambatan).

Hasil yang didapatkan untuk konsentrasi 100 ppm yaitu hambatannya 22,0%, konsentrasi 200 ppm yaitu hambatannya 50,8%, konsentrasi 300 ppm yaitu hambatannya 70,1%, konsentrasi 400 ppm yaitu hambatannya 80,3% dan konsentrasi 500 ppm yaitu hambatannya 83,6%. Sehingga didapatkan nilai  $Y = 0,154x + 1,747$  dan  $R^2 = 0,8963$ .

Setelah mendapatkan data % inhibisi maka dibuat grafik antara konsentrasi larutan (x) dan % inhibisi (y). Data % inhibisi selanjutnya dianalisis menggunakan persamaan regresi linear untuk didapatkan nilai IC<sub>50</sub>. Berikut persamaan regresi linear ekstrak daun pala dan asam askorbat.



**Gambar 2.** Persamaan regresi linear ekstrak daun pala



**Gambar 3.** Persamaan regresi linear asam askorbat

Penentuan Nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan persamaan regresi linear yang diperoleh. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> maka semakin besar aktivitas antioksidan (Molyneux,2004).

**Tabel 4.** Antioksidan berdasarkan nilai IC<sub>50</sub>

IC <sub>50</sub> <50 (mg/L)	Sifat Antioksidan
<50	Sangat Kuat
50-100	Kuat
100-150	Sedang
150-200	Lemah

Berdasarkan penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa nilai IC<sub>50</sub> dari ekstrak daun pala (*horsfieldia spicata*) sebesar 233,63 ppm sedangkan



nilai  $IC_{50}$  asam askorbat jauh berbeda dengan ekstrak daun pala yaitu sebesar daya antioksidan ekstrak daun pala lebih lemah dibandingkan antioksidan asam askorbat murni. Hal ini dapat disebabkan karena asam askorbat merupakan senyawa yang sangat murni sedangkan ekstrak daun pala masih merupakan ekstrak kasar bukan senyawa murni atau isolat. Senyawa yang dicurigai memiliki aktivitas antioksidan pada ekstrak daun pala adalah flavonoid dan senyawa fenolik. Menurut Kahkonen et al (1999) senyawa fenolik telah dilaporkan mempunyai aktivitas antioksidan karena sifat reduksinya. Flavonoid dapat bereaksi sebagai antioksidan dengan menangkap radikal bebas melalui pemberian atom hidrogen pada radikal tersebut. Secara umum, kemampuan flavonoid dalam menangkap radikal tergantung dari substitusi gugus hidroksi dan kemampuan stabilisasi dari radikal fenolik melalui ikatan hidrogen atau melalui delokalisasi elektron. Selanjutnya radikal fenoksi flavonoid tersebut distabilkan oleh delokalisasi elektron yang tidak berpasangan di sekitar cincin aromatik. Stabilitas radikal fenoksi flavonoid (reactive oxygen) akan mengurangi kecepatan perambatan (propagasi) autooksidasi reaksi berantai.

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun pala (*horsfieldia spicata*) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 233,64 ppm.

14,91 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa

### UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (LPPM) Universitas Muhammadiyah Jakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui skema hibah Pengabdian Kepada Masyarakat Internal Universitas Muhammadiyah Jakarta Tahun 2024 dengan nomor surat kontrak Penelitian 386 Tahun 2024.

### DAFTAR PUSTAKA

- BPOM RI. Pedoman Cara Pembuatan Simplisia Yang Baik. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2013.
- BPOM RI. Pedoman Teknologi Formulasi Sediaan Berbasis Ekstrak. Jakarta: Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia, 2012.
- Daud, M. F., Esti, R. S. Dan Endah, R. 2011. Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) Berdaging Buah Putih. *PROSIDING nApp2011 Sains, Teknologi, dan Kesehatan*, 2(1), 55-62
- Molyneux, P. 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakar J. Sci. Technol*, 26(2) : 211-219
- Nabavi S.F., et al. 2011, Antioxidant Activity of Wild Medlar (*Mespilus germanica*) Fruits, Stem Bark and Leaf, *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(2): 283-9