

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mangrove *Sonneratia alba* Dari Kecamatan Tagulandang, Sulawesi Utara Menggunakan Metode DPPH

Rallia Binuni^{1*}, Wilmar Maarisit¹, Hariyadi², Yappy Saroinsong²

¹Program Studi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Kristen Indonesia Tomohon

²Program Studi Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Kristen Indonesia Tomohon

*Penulis Korespondensi; ralliabinuni@gmail.com

Diterima : 12 Desember 2019 Disetujui : 20 Januari 2020

ABSTRAK

Antioksidan merupakan senyawa kimia yang berperan penting dalam perlindungan sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Salah satu tanaman mangrove yang berkhasiat sebagai alternatif obat tradisional dan berpotensi sebagai antioksidan adalah *Sonneratia alba*. Daun *S. alba* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid yang dapat berperan sebagai antioksidan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba*. Metode yang digunakan adalah metode DPPH yang selanjutnya akan dianalisis menggunakan Anova. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa pada konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% *S. alba* memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Namun yang memiliki aktivitas antioksidan lebih baik adalah pada konsentrasi 80% dengan persen penghambatan radikal DPPH sebesar 74,674%.

Kata kunci: *Sonneratia alba*, antioksidan, DPPH (2,2 diphenyl -1 picrylhydrazyl)

ABSTRACT

Antioxidants are chemical compounds that play an important role in cell protection from damage caused by free radicals. One of the mangrove plants that efficacious as an alternatif of traditional medicine and potentially as an antioxidant is *Sonneratia alba*. The leaves of *S. alba* contain a compound of secondary metabolites such as flavonoids that can act as antioxidants. The aim of the study is to determine the antioxidant activity of the *Sonneratia alba* mangrove leaf extract. The method used is a DPPH method which will then be analyzed using ANOVA. The results of this study were obtained that at concentrations of 20%, 40%, 60% and 80% *S. alba* had activity as an antioxidant. But it has better antioxidant activity at a concentration of 80% with a percent inhibitory radical DPPH of 74.674.

Keywords : *Sonneratia alba*, antioxidant, DPPH (2.2 diphenyl-1 Picrylhydrazyl)

PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan hal yang penting dalam kehidupan masyarakat. Banyak masalah kesehatan pada masyarakat yang timbul akibat perilaku masyarakat dan kondisi lingkungan. Salah satunya adalah kebiasaan merokok ataupun pada perokok pasif yang dapat menyebabkan peningkatan berbagai penyakit degeneratif pada beberapa sistem organ, yaitu sistem pernafasan, sistem kardiovaskular, dan sistem imun. Kerusakan pada berbagai sistem organ tersebut disebabkan oleh berbagai macam zat toksik dalam bentuk gas maupun zat kimia yang volatil, iritan dan radikal bebas [1].

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya. Dalam tubuh manusia, radikal bebas bersifat sangat reaktif dan akan berinteraksi secara destruktif melalui reaksi oksidasi dengan bagian tubuh maupun sel – sel tertentu yang tersusun atas lemak, protein, karbohidrat, DNA dan RNA sehingga memicu berbagai penyakit. Oleh sebab itu, tubuh membutuhkan antioksidan untuk mengatasi radikal bebas [2].

Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas tersebut dapat diredam [3]. Antioksidan diyakini berperan penting dalam perlindungan sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Peran antioksidan juga dapat mencegah oksidasi dan dapat melindungi tubuh dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) [4].

Salah satu tanaman mangrove yang sangat penting bagi pengobatan ialah *Sonneratia alba*. *S. alba* mengandung senyawa metabolit sekunder adalah flavonoid, triterpenoid, saponin dan tanin [6]. Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada semua tanaman dan banyak digunakan dalam pengobatan tradisional sebagai antioksidan, antikoagulan, antihipertensi, antivirus dan antiinflamasi.

Berdasarkan latar belakang di atas, penulis tertarik untuk menguji aktivitas ekstrak daun mangrove *Sonneratia alba* dari Kecamatan Tagulandang sebagai antioksidan.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Kristen Indonesia Tomohon dan di laboratorium Farmasi Universitas Sam Ratulangi Manado. Waktu pelaksanaan penelitian dilakukan pada bulan Oktober - November 2019.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Sarung tangan, masker, beker gelas, labuerlenmeyer, kertas saring, batang pengaduk, toples, aqua 1 liter, labu destilasi 1000 ml, timbangan analitik, rotary evaporator, corong, pipet, kapas 25 gr, aluminium foil, buret, klem, statif, pompa udara aquarium, sapu lidi, botol vial, gelas, kertas plat KLT, mikropipet, penggaris, gunting, pensil, label, kuvet, cawan petri, Uv Vis Spektrofotometer UV – 1800. Bahan yang digunakan adalah Sampel daun *S. alba* sebanyak 500 gram, etanol 70%, es batu, air aqua, 30 gr ODS (oktadesil silika) dan metanol.

Prosedur Kerja

Pengambilan Sampel

Sampel diambil di daerah pesisir pantai kecamatan Tagulandang Sulawesi Utara. *S. alba* diambil pada bagian daun kemudian dimasukkan kedalam kantong plastik. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir untuk mengeluarkan pasir dan kotoran yang melekat. Sampel yang telah dibersihkan kemudian di masukkan ke dalam kulkas.

Pembuatan Ekstrak

Sampel ditimbang sebanyak 500 gram dan kemudian dimaserasi dengan etanol 70%. Sampel yang sudah direndam dengan etanol disimpan selama 1 x 24 jam dan sesekali diaduk. Proses ini dilakukan selama 3 hari dan di filtrasi menggunakan kertas saring. Setelah di saring akan menghasilkan filtrat pertama, kedua dan ketiga yang selanjutnya dievaporasi menggunakan *Rotary vaccum Evaporator* agar didapat ekstrak kental.

Kromatografi Kolom

Pada kolom kromatografi dimasukkan kapas yang telah di basahi oleh metanol. Setelah itu, masukkan ke dalam kolom kromatografi bubuk oktadesil silika 30 gram yang telah direndam selama 1 malam dengan metanol. Kemudian, masukkan ekstrak kental ke dalam kolom kromatografi di batas atas oktadesil silika. Selanjutnya kombinasi pelarut metanol dan air dimasukkan secara terus menerus bersamaan dibukannya keran kolom. Larutan yang dimasukkan terdiri dari 20%, 40%, 60%, dan 80% metanol. Fraksi kemudian di pisahkan sesuai konsentrasi lalu di tampung didalam botol vial dan kemudian dievaporasi menggunakan *Rotary vaccum Evaporator*. Setelah itu setiap fraksi akan di analisis dengan Kromatografi lapis tipis.

Tahapan Uji Aktivitas Antioksidan

Uji Antioksidan Kualitatif Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Dalam pengujian antioksidan kualitatif metode yang tepat digunakan adalah metode KLT dibuat batas atas dan batas bawah dengan menggunakan pensil [7]. Sampel di totolkan pada plat KLT kemudian dimasukkan pada gelas kaca yang berisi larutan pengembang yaitu etil asetat dan heksan dengan perbandingan yang berbeda. Setelah itu KLT dibiarkan hingga larutan pengembang bergerak mencapai garis batas atas pada plat KLT dan diamati spot pemisahan senyawa yang terbentuk secara kasat mata serta menggunakan *spectrophotometry*.

Pada uji antioksidan kualitatif dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pertama – tama ekstrak kasar dipisahkan dengan menggunakan KLT, kemudian plat KLT disemprot menggunakan larutan DPPH (2,2 *diphenyl* - 1picrylhydrazyl). Setelah itu plat KLT disemprot dengan larutan DPPH. Reaksi aktivitas antioksidan dapat diamati dengan terbentuknya spot berwarna kuning pada plat KLT [8] .

Uji Antioksidan Kuantitatif menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

1. Pembuatan Larutan DPPH 0.1 mM

Serbuk DPPH (BM 394, 32) 0.39432 gram dilarutkan dengan methanol p.a 10 ml. Larutan DPPH 0.1mM dipipet 100 μ l dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0.1 mM).

2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 0.1 mM sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan metanol p.a 2 ml, divortex hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400 – 800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 517 nm [9].

3. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 0.1 mM sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan metanol p.a 2 ml, divortex hingga homogen, diinkubasi dalam ruang gelap selama 26 menit, selanjutnya serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

4. Pengukuran Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

Sebanyak 1.5 ml sampel hasil KLT masing – masing konsentrasi larutan uji dimasukkan kedalam botol vial, ditambahkan 1.5 ml larutan DPPH 0.1 mM, divortex hingga homogen, diinkubasi dalam ruang gelap selama 26 menit. Selanjutnya serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm.

5. Penentuan Persen Inhibisi

Uji aktivitas antioksidan kuantitatif dilakukan dengan cara mencampurkan larutan DPPH menggunakan methanol dan ekstrak yang telah dilarutkan dalam methanol [10]. Konsentrasi ekstrak *S. alba* yang digunakan adalah 20%, 40%, 60% dan

80%. Larutan DPPH yang telah dicampur dengan metanol dan ekstrak kemudian dihomogenkan di dalam botol vial dan didiamkan selama 26 menit. Kemudian setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombangnya 517 nm . Aktivitas penangkal radikal bebas diekspresikan sebagai % inhibisi yang dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ inhibisi DPPH} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi bahan uji}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

6. Penentuan Nilai IC₅₀ (Inhibitory Concentration)

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya diplot masing – masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear. Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan IC₅₀ dari masing – masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC₅₀ [11].

Analisis Data

Pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl) dianalisis dengan melihat perubahan warna masing–masing sampel setelah diinkubasi bersama DPPH. Jika semua elektron DPPH berpasangan dengan elektron pada sampel ekstrak maka akan terjadi perubahan warna sampel dimulai dari warna ungu tua yang menjadi warna kuning terang. Setelah itu larutan di hitung nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV – Vis dengan panjang gelombang 517 nm.

Data dianalisis dengan metode ANOVA (Analysis of variant) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$). Jika ada perbedaan yang signifikan maka dilanjutkan dengan uji Tuckey HSD 5% untuk melihat perlakuan mana yang memberikan efek yang berbeda.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

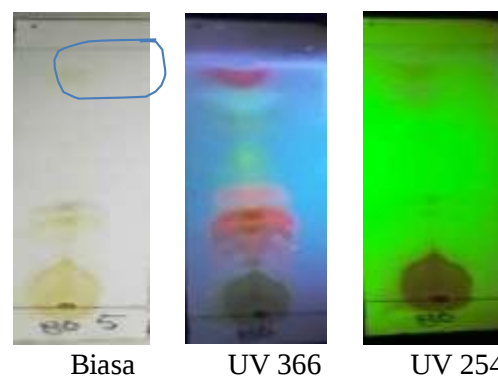
Dari hasil penelitian ini didapatkan ekstrak kental 28.85 gram melalui proses evaporasi. Kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan kolom

kromatografi dengan menggunakan kombinasi pelarut methanol ; air yaitu 20%, 40%, 60% dan 80%. Fase diam yang digunakan adalah oktadesil silika (C₁₈) tujuannya adalah untuk mengisolasi senyawa– senyawa yang polar. Dapat dilihat pada Tabel 1. Sebagai berikut :

Tabel 1. Hasil Pemisahan Kromatografi Kolom

Fase Diam	Fase Gerak	Fraksi	Gram
	Methanol + Air		
30 gram ODS	20 ml + 80 ml	20%	5.03
	40 ml + 60 ml	40%	3
	60 ml + 40 ml	60%	1.01
	80 ml + 20 ml	80%	0.52

Hasil Uji Antioksidan Kualitatif KLT



Gambar 1. Hasil KLT Pada Fraksi Methanol 80% Sebelum, Setelah Disinari UV 366 dan 254.

Pada fraksi 80%, 60%, 40% dan 20% yang di totolkan pada plat KLT terdapat spot berwarna kuning. Spot berwarna kuning menandakan bahwa pada ekstrak *S. alba* terdapat aktivitas antioksidan. Uji antioksidan kualitatif ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya aktivitas antioksidan dari ekstrak *S. alba*. Ekstrak *S. alba* ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi dengan eluen yang sesuai dan disemprot dengan larutan DPPH. Salah satu jenis senyawa yang ampuh dalam hal kemampuan antioksidan adalah flavonoid jenis Quercetin. Quercetin adalah flavonol yang ditemukan banyak pada buah dan sayuran. Quercetin telah menunjukkan kemampuan untuk mencegah oksidasi low-density lipoprotein (LDL) dengan menangkal radikal bebas dan ionion transisi sehingga quercetin

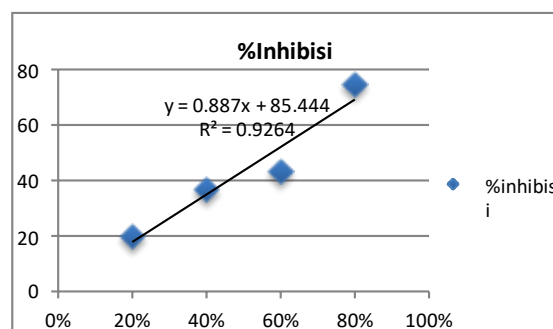
membantu dalam pencegahan penyakit tertentu, seperti kanker, aterosklerosis, dan peradangan kronis, yang umumnya disebabkan oleh adanya ikatan rangkap pada flavon cincin aromatik pusat yang ditandai oleh struktur planar [12].

radikal DPPH (% inhibisi). Data dari nilai % inhibisi baik terhadap ekstrak *S. alba* maupun vitamin C dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Antioksidan Kuantitatif

Konsentrasi Sampel	Ulangan absorbansi			Rata-rata Absorbansi	%Inhibisi	IC ₅₀
	U1	U2	U3			
20%	0.704	0.711	0.617	0.677	19.881	39.95ppm
40%	0.563	0.544	0.500	0.535	36.686	
60%	0.490	0.485	0.467	0.480	43.195	
80%	0.191	0.202	0.251	0.214	74.674	
Vitamin C	0.366	0.564	0.236	0.388	54.082	

Dari Tabel 2, dapat dijelaskan bahwa penghambatan radikal bebas terhadap ekstrak *S. alba* menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka absorbansi dari *S. alba* semakin menurun, yang artinya *S. alba* dapat menangkal atau meredam radikal bebas DPPH. Aktivitas antioksidan metode DPPH dinyatakan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi sampel yang dapat menghambat aktivitas DPPH sebanyak 50%. Berdasarkan data uji aktivitas antioksidan, nilai IC₅₀ ekstrak etanol *S. alba* didapat dari hasil perhitungan regresi linear. Variabel y pada persamaan ini adalah sebagai IC₅₀, variable a dan b adalah konstanta, sedangkan variable x yang didapat merupakan besarnya konsentrasi yang diperlukan untuk meredam 50% radikal DPPH. Nilai $r = 0.9264$ menggambarkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Dari kurva konsentrasi ekstrak dengan menggunakan program excel 2010 diperoleh persamaan regresi linear dalam penelitian ini adalah $y = 0.887x + 85.444$ hal ini dapat dilihat dari kurva dibawah ini :



Gambar 2. Kurva Nilai %Inhibisi

Uji Statistik

Tabel 3. Hasil Anova dari Ekstrak Daun Mangrove *S. Alba* Terhadap Aktivitas Antioksidan.

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F hitung	Sig.
Between Groups	.356	4	.089	13.804	.000
Within Groups	.064	10	.006		
Total	.420	14			

Ke-5 varians terbukti sama baru dilakukan uji Anova untuk menguji apakah ke-5 perlakuan mempunyai rata-rata yang sama untuk nilai absorbansi dari aktivitas antioksidan. Berdasarkan tabel 3 ANOVA

Hasil Analisis Uji Antioksidan Kuantitatif

Hasil pengukuran absorbansi dari blanko DPPH diperoleh bahwa panjang gelombang optimum DPPH berada pada 517 nm. Dari nilai absorbansi yang diperoleh dapat ditentukan nilai presentase penghambatan

nilai F hit. $25,271 > F \text{ tab } 5\% (4:10) = 3,48$. Jika nilai F hitung $> F \text{ tabel}$ maka disimpulkan bahwa ke-5 perlakuan memberikan rata-rata nilai absorbansi yang tidak identik atau berbeda. Dengan demikian ada pengaruh nilai absorbansi pada aktivitas antioksidan. Karena F hitung *significant* maka untuk melihat perlakuan yang memberi efek yang sama dilanjutkan dengan uji perbandingan menggunakan Tukey HSD 5% seperti ditunjukkan pada tabel berikut ini :

		Subset for alpha = 0.05			
	Perlakuan	N	1	2	3
Tukey HSD ^a	Konsentrasi 80%	3	.21467		
	Vitamin-C	3	.38867	.38867	
	Konsentrasi 60%	3		.48067	.48067
	Konsentrasi 40%	3		.53567	.53567
	Konsentrasi 20%	3			.67733
	Sig.		.133	.240	.078

Tabel 4. Uji perbandingan dengan Tukey HSD 5%.

Dari Tabel 4 diatas adalah hasil uji perbandingan dengan Tukey HSD 5% untuk perlakuan yang berada dikolom yang sama berarti memberikan efek yang sama untuk nilai absorbansi. Jadi terlihat untuk Konsentrasi 80% dan Kontrol Positif yaitu Vitamin C memberikan efek yang sama terhadap nilai absorbansi. Dari tabel tersebut juga terlihat yang lebih efektif dari ke 4 konsentrasi yaitu konsentrasi 80% .Karena memiliki aktivitas antioksidan lebih baik dari kontrol positif dan memiliki rata-rata nilai absorbansi yang bagus dari kontrol positif.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi 20%, 40%, 60% dan 80% *S. alba* memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Namun yang memiliki aktivitas antioksidan lebih baik adalah pada konsentrasi 80% dengan persen penghambatan radikal DPPH sebesar 74,674.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Fitria, Triandhini R.I.N.K , Mangimbulude J.C., dan Karwur. 2013. Merokok Dan Oksidasi DNA. *Sains Medika*. 5 (2) : 113-120.
- [2] Dewi T. Rosahdi, Kusmiyati, dan Fitria R. Wijayanti. 2013. Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih Dengan Metode DPPH. *Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung*. 7(1): 1-15
- [3]. Romadanu, Siti H. Rachmawati dan Shanti D. Lestari. 2014. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Lotus (*Nelumbo nucifera*). *Program Studi Teknologi Hasil Perikanan*. Palembang. 3(1) : 1 -7
- [4]. Omodamiro O.D dan Ikekamma O.C. 2016. In vitro Study of Antioxidant and Anticoagulant Activities of Ethanol Extract of Pandanus Tectorius Leaves. *International Blood Research & Reviews*. hal 1. Nigeria. 5(1) : 1-11
- [5]. Musa J.A.W, Duengo S dan Boima S. 2018. Isolation and Characterization Triterpenoid Compound from Leaves Mangrove Plants (*Sonneratia alba*) ad antibacterial Activity Test. *International Research Journal Of Pharmacy*. Indonesia. 9(3) : 85-89
- [6] Rahmanian N, Herpandi, dan Rozirwan. 2018. Phytochemical Test of Mangrove *Avicennia alba*, *Rhizophora apiculata* and *Sonneratia alba* from Musi River Estuary, South Sumatera. *Biovalentia: Biological Research Journal*. 4(2) : 1-18
- [7]. Devi, G.,John, A, Devi R. S. dan Prabhakaran, V. A. 2011. Pharmacognostical Studies on *Acacia Catechu* Willd and Identification of Antioxidant Principles. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3:108-111.
- [8] Kuntorini, E. M. dan Astuti, M. D. 2010. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bulbus Bawang Dayak (*Eleutherine Americana* Merr). *Jurnal Sains dan Terapan Kimia*. 4(1) : 15-22.

- [9] Musfiroh, E. dan Syarif, S. H. 2012. Uji aktivitas peredaman radikal bebas nanopartikel emas dengan berbagai konsentrasi sebagai material antiaging dalam kosmetik. *UNESA Journal of Chemistry*. 1(2) : 18-25.
- [10] Ghosal, M. dan Mandal, P. 2012. Phytochemical screening and antioxidant activities of two selected 'Bihi' fruits used as vegetables in Darjeeling Himalaya. *International Journal Of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(2) : 567-574
- [11] Nurjanah, Laili Izzati dan Asadatin. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (*Solen spp*). *Ilmu Kelautan*. 16(3) : 119-124.
- [12] Arifin dan Ibrahim. 2018. Struktur, Bioaktivitas dan Antioksidan Flavonoid. *Jurnal Zarah*. 6(1) : 21-29