

IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI DAUN MOJO (*Aegle Marmelos L.*) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (1,1 Difenil-2-pikrilhidrazil)

Ahmad Purnawarman Faisal, Azhari

Analisis Kesehatan, Poltekkes Kemenkes Kaltim, Jl. Kurnia Makmur No.64

Abstract

Antioxidants are compounds which can inhibit oxidation reactions by binding the free radicals and highly reactive molecules. Mojo (*Aegle marmelos L.*) contains saponins, tannins, flavonoids, and alkaloids. The existence of flavonoid compound in Mojo leaves triggered the researcher to conduct a research with the aim to know the antioxidant activity on fraction of n-hexane, ethyl acetate fraction, water fraction and ethanol extract to DPPH radical with parameter of IC_{50} and to know the fraction of ethanol extract of mojo leaf which has the highest antioxidant activity.

Mojo leaf powder is macerated using ethanol. The ethanol extract was then fractionated with n-hexane, ethyl acetate and water solvents to separate the compounds based on their polarity. The compound content in the fractions and extracts were analyzed by KLT. The fraction and extract obtained were tested for their antioxidant activity against DPPH radical using spectrophotometer at 517 nm wavelength and determined IC_{50} price to be used as a positive control in this study.

The results showed that the fraction of n-hexane, ethyl acetate fraction, water fraction and ethanolic extract had IC_{50} value of 76.14 ppm; 48.13 ppm; 59.71 ppm; 65.67 ppm. The ethyl acetate fraction has the highest antioxidant activity.

Keywords: *Aegle marmelos L.*, Antioxidant, DPPH, Mojo

Abstrak

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Mojo (*Aegle marmelos L.*) mengandung saponin, tanin, flavonoid, dan alkaloid. Adanya senyawa flavonoid maka dilakukan penelitian ini dengan tujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol terhadap radikal DPPH dengan parameter IC_{50} dan untuk mengetahui fraksi dari ekstrak etanol daun mojo yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi.

Serbuk daun mojo dimaserasi menggunakan etanol. Ekstrak etanol kemudian difraksinasi dengan pelarut n-heksana, etil asetat dan air untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya. Fraksi dan ekstrak dianalisis kandungan senyawa secara KLT. Fraksi dan ekstrak yang didapatkan diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal DPPH menggunakan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm dan ditentukan harga IC_{50} . Rutin digunakan sebagai kontrol positif dalam penelitian ini.

Hasil penelitian menunjukkan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanolik memiliki nilai IC_{50} sebesar 76,14 ppm ; 48,13 ppm ; 59,71 ppm ; 65,67 ppm. Fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang paling tinggi.

Kata kunci: *Aegle marmelos L.*, Antioksidan, DPPH, Mojo

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan berbagai macam tumbuhan obat. Dari sekitar 30.000 spesies tumbuhan Indonesia, sekitar 940 di antaranya adalah tumbuhan obat. Tumbuhan obat sebagai obat asli Indonesia, sudah ada sejak zaman nenek moyang kita yaitu digunakan dalam upaya memelihara kesehatan dan mengobati penyakit. Masyarakat Indonesia telah lama memanfaatkan tumbuhan obat sebagai obat tradisional. Obat tradisional adalah bahan atau ramuan bahan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan, hewan, dan mineral, sediaan sarian (galenik) atau campuran dari bahan tersebut yang secara turun temurun telah digunakan untuk mengobati.

Banyak penemuan yang menunjukkan bahwa perkembangan penyakit disebabkan oleh radikal bebas. Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya. Terbentuknya radikal bebas dalam tubuh akan terjadi reaksi berantai dan menghasilkan reaksi radikal bebas baru yang akhirnya bertambah banyak, selanjutnya akan menyerang

sel-sel tubuh kita sehingga terjadilah berbagai penyakit (Khomsan 2009). Dampak reaktivitas senyawa radikal bebas bermacam-macam, mulai dari kerusakan sel atau jaringan, penyakit autoimun, penyakit degeneratif, hingga kanker (Winarsi 2007).

Senyawa antioksidan dalam makanan mempunyai fungsi penting untuk melindungi kesehatan. Antioksidan adalah substansi yang menetralkan radikal bebas (Yuliarti 2009). Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, akibat kerusakan sel akan dihambat (Winarsi 2007). Antioksidan berdasarkan sumber perolehannya dibagi menjadi 2 macam yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik) (Dalimartha dan Soedibyo 1999).

Salah satu tumbuhan obat yang ada di Indonesia adalah tumbuhan mojo (*Aegle marmelos L.*). Tumbuhan mojo juga merupakan tumbuhan yang digunakan sebagai

obat tradisional. Buah mojo dapat dimakan langsung atau dibuat serbat, sirup dan nektar buah. Buah yang matang dapat di iris-iris, dikeringkan, dan digunakan sebagai obat disentri kronis, diare, dan sembelit. Kulit buah mentah dapat digunakan sebagai cat kuning dan sebagai agen tanin. Daun ini digunakan untuk meracuni ikan. Akar mojo digunakan sebagai obat penenang debar jantung, gangguan pencernaan dan maag. Daun, akar, dan kulit mojo (*Aegle marmelos L.*) mengandung saponin, disamping itu akar dan Daunnya mengandung flavanoid dan polifenol dan daunnya juga mengandung tanin.

Senyawa antioksidan dalam makanan mempunyai fungsi penting untuk melindungi kesehatan. Antioksidan adalah substansi yang menetralkan radikal bebas (Yuliarti 2009). Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron atau reduktan. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif, akibat kerusakan sel akan dihambat (Winarsi 2007).

Antioksidan berdasarkan sumber perolehannya dibagi menjadi 2 macam yaitu antioksidan alami dan antioksidan buatan (sintetik) (Dalimartha dan Soedibyo 1999).

Antioksidan menghambat oksidasi molekul lain dengan mekanisme memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terdapat dalam tubuh sehingga kerusakan sel-sel tubuh bisa dihindari. Antioksidan seperti golongan polifenol, flavonoid, vitamin C, vitamin E dan karotenoid (beta karoten, likopen, dan lutein) mempunyai peran penting dalam membantu pencegahan kerusakan sel-sel akibat adanya radikal bebas (Hermani dan Rahardjo 2005). Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, jika terjadi paparan radikal berlebih, tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Sunarni 2005). Berbagai tanaman tradisional di sekitar kita dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan untuk meredam radikal bebas (Hermani dan Rahardjo 2005).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan

penangkapan radikal adalah metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) sebagai radikal bebas stabil yang ditetapkan secara spektrofotometri. Metode DPPH memberikan informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Difenil pikrilhidrazil (DPPH) memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm yang diikuti reaksi reduksi oleh senyawa antioksidan (Pokorny *et al.* 2001). Penangkapan radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni 2005). Difenil pikrilhidrazil (DPPH) merupakan senyawa radikal bebas yang stabil dalam penyimpanannya apabila disimpan dalam bentuk kering dan dalam kondisi penyimpanan yang baik. Metode ini cukup sederhana dan mudah dikerjakan (Windono *et al* 2001).

Berdasarkan penelitian Sri Nur Cahyati tahun 2008 diketahui bahwa ekstrak daun mojo memiliki aktivitas sebagai larvasida, tetapi belum dapat diketahui apakah

tumbuhan ini memiliki aktivitas lainnya, dan pada penelitian Meirinda Tika tahun 2013 dilakukan pengujian dasar untuk menentukan bioaktivitas dari tumbuhan ini. Salah satu cara untuk menguji bioaktivitas ekstrak tumbuhan sebagai antikanker yaitu dengan metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*). Bioaktivitas adalah suatu kemampuan suatu senyawa aktif yang terkandung dalam tumbuhan yang dapat memberikan pengaruh terhadap organisme tertentu. Dari penelitian ini diketahui bahwa ekstrak tumbuhan mojo memiliki bioaktivitas terhadap organisme dalam hal ini larva udang.

Dari hasil ini maka dapat dikembangkan ke penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktivitas tumbuhan sebagai usaha pengembangan obat alternatif dan dapat dikembangkan juga ke penelitian lebih lanjut untuk meneliti khasiat-khasiat lain dari ekstrak tersebut (Hendrawati, 2009).

METODE PENELITIAN

Tahapan penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel

tumbuhan mojo berkaitan dengan ciri-ciri tumbuhan mojo, Identifikasi tumbuhan dilakukan di Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman.

Daun mojo yang digunakan adalah daun yang telah kering dari daerah Sebulu, Kutai Kartanegara. Simplisia disimpan dalam wadah kering tertutup rapat yang selanjutnya siap digunakan untuk penelitian.

Ekstrak etanol Daun mojo masing-masing dihitung 0,0250 gram, kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, selanjutnya ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas sehingga didapat konsentrasi 500 ppm, maka larutan ini yang disebut dengan larutan stok. Konsentrasi larutan uji dibuat dengan memipet larutan stok untuk mendapat 5 seri konsentrasi. Pembuatan larutan stok rutin dilakukan dengan cara menimbang 0,0125 gram rutin kemudian dilarutkan dengan metanol p.a sampai larut dan dimasukkan ke dalam labu ukur 25 ml, selanjutnya ditambah metanol p.a sampai tanda batas dan selanjutnya dibuat 5 seri

konsentrasi yang pembacaan absorbansi adalah 0,2-0,8. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet sebanyak 4,0 ml, kemudian ditambahkan dengan 1 ml larutan pereaksi DPPH 0,45 mM dalam vial, dan didiamkan selama 30 menit kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan (517 nm). Percobaan dilakukan 3 kali pengulangan juga pengamatan terhadap larutan kontrol dari 4 ml metanol ditambah 1 ml DPPH 0,45 mM.

Analisis data hasil pengukuran absorbansi yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk menghitung prosentase aktivitas penangkap radikal bebas dari berbagai konsentrasi uji. Harga IC_{50} dihitung dari persamaan regresi linear antara probit dari persen (%) peredaman radikal (% radikal) versus logaritma berbagai konsentrasi uji.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun mojo sebanyak 4500 gram dikeringkan pada suhu 40°C dan diperoleh 640 gram daun kering dengan rendemen 14,22

%^b/_b.Pengeringan daun mojo dilakukan pada suhu 40°C dalam oven, apabila pengeringan suhu lebih dari 50°C dikhawatirkan terjadi kerusakan pada kandungan senyawa-senyawa aktif pada simplisia. Kelebihan pengeringan menggunakan oven adalah suhu bisa diatur sesuai keinginan.

Didapatkan 15,10 gram ekstrak etanol dengan rendemen 9,05

%^b/_bdari 400 gram serbuk daun mojo. Ekstrak etanol daun mojo yang diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n-heksana*, etil asetat, dan air.

Hasil rendemen dari fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, fraksi air, dan ekstrak etanol daun mojo dapat dilihat pada tabel berikut

Tabel 1 Hasil rendemen dari masing-masing fraksi

Berat ekstrak (gram)	Fraksi	Berat cawan	Cawan + zat	Zat	Rendemen (% ^b / _b)
15,1075	<i>n-heksana</i>	23,0505	24,4143	1,3638	9,03
	etil asetat	23,0506	23,7879	0,7370	4,88
	air	32,1261	47,1328	13,0067	86,09

Sumber: Data Primer

Berdasarkan tabel, terdapat hasil rendemen dari masing-masing fraksi adalah rendemen fraksi *n-heksana* 9,03 %^b/_b, fraksi etil asetat 4,88 %^b/_b, fraksi air 86,09 %^b/_b. Rendemen terlihat bahwa ekstrak etanol daun mojo paling banyak mengandung senyawa polar dan paling sedikit mengandung senyawa semipolar.

Identifikasi kromatografi lapis tipis bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa-

senyawa kimia pada fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol daun mojo. Senyawa yang diidentifikasi antara lain flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid. Hasil kromatografi lapis tipis (KLT) pada fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol daun mojo dapat dilihat pada tabel.

Tabel 2 Hasil identifikasi kromatografi lapis tipis

No	Senyawa	Larutan uji	Fase diam	Fase gerak	Rf	Pereaksi	Warna
A.	Flavonoid	1. Ekstrak 2. F. n-heksana 3. F. etil asetat 4. F. Air	Selulosa	Butnol : a. asetat :air	0,80 0,76 0,73 0,83	Sitroborat	Kuning
B.	Saponin	1. Ekstrak 2. F. n-heksana 3. F. etil asetat 4. F. air	Silika GelGF ₂₅ 4	Kloroform: metanol: air	0,80 0,75 0,70 0,76	Anisaldehyd	Kuning lemah
C.	Tanin	1. Ekstrak 2. F. n-heksana 3. F. etil asetat 4. F. air	Silika GelGF ₂₅ 4	Butnol : a. asetat :air	0,78 0,71 0,35 0,76	FeCl ₃ 1%	Hijau lembayung
D.	Alkaloid	1. Ekstrak 2. F. n-heksana 3. F. etil asetat 4. F. air	Silika GelGF ₂₅ 4	Metanol: etil asetat	- - 0,91 -	Dragendrof	Kuning jingga

Sumber: Data Primer

Hasil identifikasi kromatografi lapis tipis (KLT) masing-masing kandungan senyawa dapat disimpulkan bahwa tumbuhanmojo (*Aegle marmelos* L.) mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin pada ekstrak maupun fraksi-fraksi sedangkan alkaloid terdapat pada fraksi etil asetat. Bercak yang timbul pada lempeng KLT kemudian dihitung nilai Rf dan hRfnya untuk mengetahui keberadaan kandungan senyawa pada ekstrak dan masing-masing fraksi.

Pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH yang didapatkan pada penelitian ini adalah 517nm dengan absorbansi sebesar 0,834. Grafik panjang gelombang maksimum DPPH 0,45 mM dapat dilihat pada gambar 1

Hasil pengujian konsentrasi peredaman DPPH dan aktivitas antioksidan

Hubungan konsentrasi larutan uji terhadap peredaman DPPH dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hubungan konsentrasi larutan uji terhadap peredaman DPPH

NO	Larutan uji	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata peredaman (%)
1	Ekstrak	100	63,15
		80	52,92
		60	46,64
		40	38,49

			20	20,62
2	Fraksi <i>n</i> - <i>heksana</i>		120	72,46
			100	63,67
			80	47,88
			60	38,61
			40	22,58
3	Fraksi etil asetat		80	64,86
			60	55,09
			40	41,22
			20	30,13
			10	16,43
4	Fraksi air		100	70,95
			80	62,90
			60	43,91
			40	34,41
			20	16,75
5	Rutin		10	66,11
			8	63,71
			6	49,58
			4	38,21
			2	19,16

Berdasarkan tabel 3, terlihat bahwa aktivitas peredaman radikal yang paling kuat adalah fraksi etil asetat karena mampu meredam radikal bebas dengan konsentrasi terkecil yaitu 10 ppm dilanjutkan dengan fraksi air dan ekstrak etanol dengan konsentrasi 20 ppm dan yang memiliki aktivitas peredaman paling kecil dibandingkan fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol dengan konsentrasi 40 ppm yaitu fraksi *n*-*heksana*. Secara keseluruhan aktivitas peredaman radikal yang kuat adalah rutin hal ini disebabkan karena rutin merupakan senyawa murni sedangkan ekstrak etanol dan masing-masing fraksi bukan merupakan senyawa murni.

Berdasarkan data konsentrasi uji dan persen peredaman dapat disimpulkan bahwa adanya hubungan yang berbanding lurus antara konsentrasi dengan persen peredaman, yaitu semakin tinggi konsentrasi larutan uji maka semakin tinggi juga persen peredamannya. Pengujian prosentase peredaman larutan uji pada fraksi *n*-*heksana*, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol dilakukan 3 replikasi tiap konsentrasi. Rutin digunakan sebagai pembandingan dalam metode DPPH ini disebabkan karena rutin telah diketahui sebagai glikosida flavonoid yang sudah terbukti aktivitas antioksidannya.

Metode DPPH memberikan

informasi reaktivitas senyawa yang diuji dengan suatu radikal stabil. Proses peredaman radikal bebas oleh senyawa antioksidan dapat dilihat dari perubahan warna violet larutan DPPH menjadi warna kuning diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang 517 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum dapat dilihat pada lampiran 7. Perubahan warna tersebut menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang dapat dilihat dari persentase peredamannya. Radikal bebas DPPH akan mengambil atom hidrogen yang terdapat pada suatu senyawa.

Proses perubahan warna yang terjadi karena berkurangnya ikatan rangkap terkonjugasi pada DPPH. Hal ini terjadi apabila adanya penangkapan satu elektron oleh zat antioksidan, menyebabkan tidak adanya kesempatan elektron untuk beresonansi. Reaksi DPPH dapat dilihat pada gambar 3.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang identifikasi metabolit sekunder dan uji aktivitas

antioksidan tumbuhan mojo dapat diambil kesimpulan: (1) rendemen fraksi *n-heksana* 9,03 % ^b/_b, fraksi etil asetat 4,88 % ^b/_b, fraksi air 86,09 % ^b/_b. Rendemen terlihat bahwa ekstrak etanol daun mojo paling banyak mengandung senyawa polar dan paling sedikit mengandung senyawa semipolar. (2) Fraksi *n-heksana*, fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol daun mojo secara berturut-turut memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ sebesar 76,14 ppm, 48,13 ppm, 59,71 ppm, 65,67 ppm. (3) Fraksi etil asetat adalah fraksi yang mempunyai aktivitas antioksidan paling tinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih saya ucapkan untuk semua anggota yang telah membantu keterlaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK and Lichtman AH. 2002., *Cellular and molecular immunology*, 6th edition. Philadelphia: Elsevier Science.
- Ahmad N. 2006. *Fitokimia II*. Fakultas Farmasi.

- Universitas Muslim
Indonesia
- Ethnobot. Med. Plants India
and Nepal, Scientific
Publishers, Jodhpur, 29-
35.
- Ansel HC. 1989. *Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi*. Ibrahim F, penerjemah; Jakarta: UI Press. Terjemahan dari: *Pharmaceutical Dosage Forms, and Drug Delivery System*.
- Wijayakusuma H. 1994. *Tanaman Berkhasiat Obat Indonesia*. Jilid 3. Jakarta: Pustaka Kartini
- Backer. C. A. & R. C. Bakhuizen van den Brink, Jr. 1968. *Flora of Java*.
- Dahlan, S.M. 2008, *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*, Edisi V, 1-112, Salemba Medika, Jakarta.
- Dhankhar. S. 2011. *Aegle marmelos (Linn.) Correa: A Potential Source of Phytomedicine, Journal of Medicinal Plants Research*, Vol 5(9)
- Flora E. 2011. *Tanaman Obat Indonesia untuk pengobatan Herbs Medicine Herba Tanaman Obat, Indonesia*
- Gandjar I.G. dan Rohman A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan III. Pustaka Pelajar; Yogyakarta
- Ganong W.F. 1979. *Fisiologi Kedokteran*. Penerbit BUKU Kedokteran EGC., Jakarta.
- George KV. Mohanan N. 2003. *Ethnobotanical investigations of Aegle marmelos (Linn.) Corr. in:*