

Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Wiwit Denny Fitriana*, Sri Fatmawati, dan Taslim Ersam

Abstrak

Radikal bebas dan Reactive oxygen Species (ROS) merupakan penyebab terjadinya penyakit seperti kanker, diabetes, kardiovaskular dan inflamatori. Adanya peningkatan jumlah radikal bebas dan produksi ROS yang berlebih dalam tubuh dapat menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan sistem kekebalan tubuh. Oleh karena itu, diperlukan tambahan antioksidan dari luar tubuh. Selama ini ada beberapa obat sintesis antioksidan seperti (Butil Hidroksi Anisol) BHA dan (Butil Hidroksil Toluena) BHT. Namun pada penggunaannya, obat ini menimbulkan efek samping. Oleh karena itu, diperlukan sumber antioksidan dari alam yang tidak memiliki efek samping jika dikonsumsi. Daun kelor merupakan salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa polifenol seperti flavonoid, kuersetin dan kamperol serta sumber vitamin C dan vitamin E. Polifenol merupakan kandungan senyawa yang sebagian besar terdapat dalam tumbuhan yang dapat berperan sebagai antioksidan alami. Untuk mengetahui kemampuan daun kelor sebagai antioksidan, maka telah dilakukan fraksinasi dan uji bioaktivitas penangkapan radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan uji peluruhan warna pada 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin sulfonat] (ABTS) secara *in vitro* terhadap fraksi-fraksi daun kelor yang dihasilkan. Trolox digunakan sebagai kontrol positif dengan persentase penghambatan sebesar 96,61% pada uji DPPH dan 94,99% pada uji ABTS. Berdasarkan hasil uji tersebut, dapat diketahui jika fasa etil asetat menunjukkan nilai aktivitas antioksidan sebesar 85,4% uji DPPH dan 92,12% uji ABTS. Aktivitas antioksidan oleh fasa etil asetat ini dipengaruhi oleh jenis kandungan senyawa fenolat yang terdapat pada daun kelor seperti kuersetin, flavonoid dan kamperol.

Kata-kata kunci: antioksidan, DPPH, ABTS, daun kelor

Pendahuluan

Radikal bebas merupakan atom molekul yang memiliki kereaktifan tinggi, hal ini dikarenakan adanya elektron yang tidak berpasangan. Sumber radikal bebas dapat berasal dari sisa hasil metabolisme tubuh dan dari luar tubuh seperti makanan, sinar UV, polutan dan asap rokok. Jumlah radikal bebas yang terus meningkat dalam tubuh dapat mengakibatkan terjadinya stres oksidatif sel. Hal ini terjadi karena terjadi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh. Jika hal ini terus menerus terjadi maka dapat memicu munculnya penyakit degeneratif seperti kanker [1], diabetes [2], peradangan dan kardiovaskuler [3]. Oleh karena itu, diperlukan antioksidan yang berasal dari luar tubuh. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat memperlambat proses oksidasi dari radikal bebas. Mekanisme kerja senyawa antioksidan salah satunya yaitu dengan cara menodonorkan atom hidrogen atau proton kepada senyawa radikal. Hal ini menjadikan senyawa radikal lebih stabil [4]. Antioksidan sintesis yang selama ini sering digunakan oleh masyarakat yaitu (Butil Hidroksi Anisol) BHA dan (Butil Hidroksil Toluena) BHT. Namun pada penggunaannya, obat ini menimbulkan efek

samping seperti dapat merusak paru-paru dan hati serta bersifat karsinogenik [5]. Hal ini menjadikan penelitian mengenai senyawa antioksidan yang berasal dari sumber alam tumbuhan yang lebih aman sangat diperlukan.

Daun kelor merupakan salah satu tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber antioksidan. Daun kelor memiliki jumlah vitamin dan mineral yang dapat berfungsi sebagai antioksidan alami. Metode pengukuran aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan pengukuran nilai absorbansi dari DPPH radikal dan ABTS radikal kation menggunakan spektrofotometer UV/VIS. Penelitian ini bertujuan untuk menginvestigasi secara *in vitro* aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kelor yang telah difraksinasi. Dengan mengetahui aktivitas antioksidan dari daun kelor secara kuantitatif diharapkan dapat menjadikan daun kelor sebagai sumber antioksidan dan meningkatkan nilai guna dari daun kelor.

Eksperimen

➤ Ekstraksi Daun Kelor

Serbuk kering daun kelor (3 kg) dimaserasi dengan pelarut metanol (1x24 jam). Ekstrak

yang diperoleh disaring dan diperoleh ekstrak cair metanol dan residu. Ekstrak cair metanol dipekatkan dengan *rotary evaporator*, diperoleh ekstrak pekat metanol.

➤ Partisi Cair-Cair Ekstrak Daun Kelor

Ekstrak pekat (300,03 g) dipisahkan lebih lanjut dengan ekstraksi cair-cair. Ekstrak pekat dilarutkan dalam MeOH:H₂O (3:2), 740 mL, kemudian dipartisi berulang dengan *n*-heksana (2,4 L). Hasil yang diperoleh yaitu fasa *n*-heksana dan fasa air. Fasa air dipartisi cair-cair lebih lanjut dengan pelarut etil asetat dan ditambah dengan H₂O. Hasil dari partisi diperoleh fasa etil asetat dan fasa air. Ketiga fasa tersebut diuji aktivitas antioksidan terhadap DPPH dan ABTS. Fasa etil asetat yang aktif difraksinasi lebih lanjut.

➤ Fraksinasi Fasa Etil Asetat

Fasa etil asetat (40,14 g) difraksinasi dengan kromatografi kolom cair vakum (KCV). Eluen yang digunakan yaitu *n*-heksana:EtOAc (100:0→0:100) dan EtOAc:MeOH(100:0→50:50), diperoleh beberapa fraksi. Fraksi-fraksi tersebut dimonitoring dengan KLT. Fraksi yang memiliki harga R_f yang relatif sama digabungkan dan diperoleh 9 fraksi gabungan (E₁-E₉). Fraksi gabungan masing-masing diuji aktivitas penghambatannya terhadap DPPH dan ABTS.

➤ Uji DPPH

Metode uji aktivitas antioksidan DPPH dilakukan dengan sedikit modifikasi metode penelitian sebelumnya [6-7]. Larutan DPPH 6 × 10⁻⁵ M diperoleh dengan pelarutan serbuk DPPH sebanyak 1,182 mg ke dalam 50 mL metanol. Larutan uji diperoleh dengan pelarutan senyawa uji sebanyak 10 mg ke dalam 1 mL metanol. Larutan uji dipipet 33,33 μL dan dimasukkan ke dalam *tube* yang terlindung dari cahaya, kemudian ditambahkan 1 mL DPPH. Campuran larutan tersebut dikocok dengan *vortex* selama 10 detik. Selanjutnya, larutan tersebut diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Selama proses reduksi oleh antioksidan, larutan DPPH radikal akan berubah warna dari ungu menjadi kuning pucat. Penurunan absorbansi ini diukur dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang 515 nm (As). Larutan Blanko yang digunakan terdiri dari 33,33 μL metanol dalam 1 mL DPPH yang diukur pada panjang gelombang yang sama (Ab). Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Perlakuan pada uji DPPH ini dilakukan dengan tiga kali pengulangan (*triplicate*). Aktivitas penghambatan radikal dapat dihitung dengan rumus di bawah ini

$$\text{Penghambatan (\%)} = \frac{Ab-As}{As} \times 100\% \quad (1)$$

Ab : absorbansi blanko

As : absorbansi senyawa uji

➤ Uji ABTS

Metode uji aktivitas antioksidan ABTS dilakukan dengan sedikit modifikasi metode penelitian sebelumnya [8]. Larutan aquos ABTS (5 mL 7 mM) direaksikan dengan larutan aquos K₂S₂O₈ (88 μL 140 mM) ABTS radikal kation (ABTS^{•+}). Kemudian larutan tersebut didiamkan di tempat yang gelap selama 12-16 jam pada suhu ruang, dihasilkan larutan ABTS^{•+} yang berwarna biru gelap. Larutan ini dapat digunakan setelah penambahan etanol 99,5% sampai nilai absorbansinya 0,7 ± 0,02 pada panjang gelombang 734 nm. Larutan uji diperoleh dari pelarutan senyawa uji sebanyak 10 mg ke dalam 1 mL DMSO. Larutan uji diambil 10 μL dan dimasukkan ke dalam tabung yang terlindung dari cahaya, kemudian ditambahkan 1 mL ABTS^{•+}. Campuran larutan tersebut dikocok dengan *vortex* selama 10 detik. Selanjutnya, larutan tersebut diinkubasi pada suhu 30 °C selama 4 menit. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 734 nm (As). Trolox digunakan sebagai kontrol positif. Larutan blanko yang digunakan terdiri dari 10 μL DMSO 99,5 % dalam 1 mL ABTS^{•+} yang diukur pada panjang gelombang yang sama (Ab). Aktivitas antioksidan dapat dihitung dengan rumus (1).

Analisa Data Statistik

Hasil data yang diperoleh ditampilkan sebagai nilai mean ± standar deviasi (SD) dari tiga kali pengulangan data.

Hasil dan diskusi

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan daun kelor ini dilakukan dengan metode *guide fractionation* yaitu pengujian aktivitas antioksidan pada setiap tahap pemisahan yang dilakukan. Metode ini diharapkan dapat menghasilkan senyawa murni dari daun kelor yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat proses oksidasi pada senyawa radikal bebas. Pada penelitian sebelumnya daun kelor dilaporkan mengandung senyawa fenolat seperti flavonoid, asam galat, kuersetin dan *kaempferol* yang memiliki aktivitas antioksidan tinggi [9]. Senyawa-senyawa fenolat yang terdapat di dalam ekstrak daun kelor ini memiliki peran penting sehubungan dengan aktivitas kimianya.

Tahap pertama yaitu ekstraksi daun kelor dengan pelarut metanol kemudian diekstraksi cair-cair dan dihasilkan fasa *n*-heksana (70,1 gr), fasa etil asetat (200,6 gr) dan fasa air (7,6 gr).

Masing-masing fasa diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. DPPH radikal yang dilarutkan pada pelarut etanol memiliki warna ungu dengan nilai absorbansi maksimal pada panjang gelombang 515 nm pada spektrofotometer UV-VIS. Persentase penghambatan DPPH dari fasa-fasa ini dapat dilihat pada Gambar 4.

96,61±0,02
85,41±0,05 86,66±0,75
67,46±0,03

Gambar 4. Aktivitas DPPH dari fasa *n*-heksana, fasa etil asetat, fasa Air, trolox (kontrol positif), n=3, konsentrasi 322,54 µg/mL.

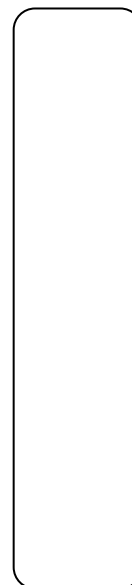
Fasa etil asetat dan fasa air menunjukkan aktivitas penghambatan DPPH yang lebih tinggi daripada fasa *n*-heksana yaitu sebesar 85,41%±0,05 dan 86,66%±0,75. Aktivitas antioksidan dari masing-masing fasa diuji lagi dengan metode radikal kation ABTS. Persentase penghambatan dari fasa-fasa ini dapat dilihat pada Gambar 5.

Pengujian ABTS dilakukan karena metode ini memiliki sensitivitas lebih tinggi daripada DPPH dan dapat dipakai untuk menganalisa antioksidan pada makanan. Berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan antara DPPH dan ABTS memiliki perbedaan mekanisme reaksinya. Pada DPPH kemampuan antioksidan suatu senyawa dilihat berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk mendonorkan hidrogen. Sedangkan pada uji ABTS kemampuan senyawa antioksidan berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan untuk menyetabilkan senyawa radikal bebas dengan mendonorkan radikal proton [9].

94,99±0,58
92,12±0,04 90,13±0,03
60,80±0,12

Gambar 5. Aktivitas ABTS dari fasa *n*-heksana, fasa etil asetat, fasa Air, trolox (kontrol positif), n=3, konsentrasi 99,00 µg/mL.

Fasa etil asetat menunjukkan aktivitas penghambatan ABTS yang paling tinggi dibandingkan fasa-fasa yang lain yaitu sebesar 92,12%±0,04. Aktivitas DPPH dan ABTS yang tinggi pada fasa etil asetat menjadikan fasa ini difraksinasi lebih lanjut dengan Kromatografi Cair Vakum (KCV) dan diperoleh 9 fraksi (E₁-E₉). Masing-masing fraksi diuji aktivitas DPPH dan ABTS dan hasilnya dapat dilihat pada gambar 6.



Gambar 6. Aktivitas DPPH dan ABTS dari fraksi-fraksi Etil asetat, n=3

Berdasarkan hasil uji antioksidan dapat dilihat bahwa fraksi E4 dan E5 memiliki potensi sebagai sumber antioksidan dikarenakan memiliki aktivitas di atas 90 %. Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh senyawa-senyawa fenolat yang berada dalam fasa yang diukur. Senyawa fenolat memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang tinggi.

Kesimpulan

Telah dilakukan fraksinasi dan uji bioaktivitas penangkapan radikal bebas 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) dan uji peluruhan warna pada 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin sulfonat] (ABTS) secara in vitro terhadap fraksi-fraksi daun kelor yang dihasilkan. Trolox digunakan sebagai kontrol positif dengan persentase penghambatan sebesar 96,61% pada uji DPPH dan 94,99% pada uji ABTS. Berdasarkan hasil uji tersebut, dapat diketahui jika fasa etil asetat menunjukkan nilai aktivitas antioksidan sebesar 85,4% uji DPPH dan 92,12% uji ABTS. Fraksi E4 dan E5 memiliki

potensi untuk difraksinasi lebih lanjut sebagai sumber antioksidan.

Ucapan terima kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DIKTI atas Hibah Riset Kerjasama Luar Negeri dan Publikasi International atas dukungan finansialnya pada penelitian ini dan Assc. Profesor Kuniyoshi Shimizhu selaku Kepala Laboratorium Systematic Forest and Forest Product Sciences, Kyushu University-Japan atas dukungan untuk pelaksanaan riset selama di Jepang.

Referensi

- [1] S.S.K. Wijeratne, S.L.Cuppett, V. Schlegel, "Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Stress Damage and Antioxidant Enzyme Response in Caco-Human colon cells", *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53, 8768-8774 (2005)
- [2] H. Sjahrir, "Diabetic Neuropathy : The Pathoneubiology & Treatment Update", USU Press, Medan 2006
- [3] R. Stocker, J.F. Keany, "Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis", *Physiological Review* 84, 1381-1478 (2004)
- [4] J. Lee, N. Koo, D.B. Min, "Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutreaceuticals", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 3, 21-33 (2004)
- [5] G. Zengin, A. Aktumsek, G.O. Guler, Y. S. Cakmak, E. Yildiztugay, "Antioxidant Properties of Methanolic Extract and Fatty acid Composition of *Centaurea urvillei* DC. Subsp. *Hayekiana* Wagenitz", *Natural Product* 5, 123-132 (2011)
- [6] B. Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity," *LWT—Food Science and Technology* 28 (1), 25–30 (1995)
- [7] S.Dudonn'e, X. Vitrac, P. Couti'ere, M. Woillez, J.-M M'erillon, "Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays," *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (5), 1768–1774 (2009)
- [8] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, "Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay", *Free Radical Biology and Medicine* 26 (9-10), 1231–1237 (1999)
- [9] Y. H. Chu, C. L Chang, H.F. Hsu, "Flavonoid Content of Several Vegetables and Their Antioxidant Activity," *Journal of the Science of Food Agriculture* 80, 561-566 (2000)

Wiwit Denny Fitriana*

Faculty of Mathematics and Natural Sciences,
Universitas Pesantren Tinggi Darul Ulum, Jombang,
Indonesia
wiwitdenny@mipa.unipdu.ac.id

Sri Fatmawati

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics
and Natural Science, Institut Teknologi Sepuluh
Nopember, Kampus ITS-Sukolilo, Surabaya,
Indonesia 60111
fatma@chem.its.ac.id

Taslim Ersam

Department of Chemistry, Faculty of Mathematics
and Natural Science, Institut Teknologi Sepuluh
Nopember, Kampus ITS-Sukolilo, Surabaya,
Indonesia 60111

*Corresponding author