

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN BEROMA (*Cajanus cajan* (L.) Milps)

Mirrawati Salampe¹, Zulfaidah Rahma¹, Syamsu Nur², Sukamto S Mamada³

¹Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar

²Akademi Farmasi Kebangsaan Makassar

³Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Kata Kunci :

Cajanus cajan (L.)
Milps, antioksidan,
DPPH, ABTS

ABSTRAK

Daun beroma (*Cajanus cajan* (L.) Milps) berpotensi sebagai antioksidan dikaitkan dengan kandungan senyawa kimia yaitu flavanoid dan fenolik. Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol 70% daun *Cajanus cajan* (L.) Milps dilakukan menggunakan metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline sulphonate] (ABTS). Nilai IC₅₀ pada pengujian metode DPPH yaitu 86,34 mg/ml dan IC₅₀ pada metode ABTS yaitu 20,53 mg/ml. Berdasarkan nilai IC₅₀ tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *Cajanus cajan* (L.) Milps mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Adanya elektron yang tidak berpasangan menyebabkan molekul tersebut sangat reaktif mencari pasangan elektron. Molekul reaktif yang mengandung oksigen disebut reactive oxygen species (ROS) dan yang mengandung nitrogen disebut reactive nitrogen species (RNS) (1).

ROS berperan dalam normal cell signaling dan homeostasis, misalnya peroksida di pembuluh darah dapat membatasi respon NO yang merupakan mediator dalam fungsi vaskular meliputi tonus otot polos dan tekanan darah, aktivasi platelet, dan vascular cell signaling. Akan tetapi, peningkatan produksi ROS melebihi batas normal menyebabkan terjadi stress oksidatif. Stress oksidatif merupakan suatu kerusakan oksidatif yang diakibatkan oleh produksi radikal bebas melampaui sistem pertahanan antioksidan (1,2)

Antioksidan merupakan molekul stabil yang dapat mendonorkan elektron dan menetralkan radikal bebas sehingga mencegah dan membatasi kerusakan intrasel serta memperbaiki efek berbahaya dari radikal bebas. Antioksidan terdiri dari dua bagian yaitu, antioksidan eksogen atau antioxidant nonenzymes (asam askorbat, vitamin E, dan glutathione) dan antioksidan endogen atau antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), catalase, dan glutathione peroxidase) (3,4).

Antioksidan yang bersifat eksogen dapat diperoleh secara alami. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa sejumlah tanaman mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan yaitu *Cajanus cajan* (L.) Millsp dikaitkan dengan

kandungan senyawa yaitu flavanoid, asam cajaninstilbene (3-hydroxy-4-prenylmethoxy-stilbene-2-asam karboksil), pinostrobin, vitexin dan orientin (5).

Berdasarkan uraian tersebut, maka dilakukan penelitian untuk menentukan aktivitas antioksidan daun beroma (*Cajanus cajan* (L.) Millsp dengan menggunakan metode 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) dan 2,2'-azino-bis-[3-ethylbenzothiazoline sulphonate] (ABTS).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan yaitu aluminium foil, batang pengaduk, cawan porselin, labu takar, lampu spiritus, spektrofotometer UV-Vis, timbangan analitik dan alat-alat glass.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini aquadest, etanol 70%, etanol absolut, daun beroma, FeCl₃, H₂SO₄, HCl pekat, HCl 2 N, K₂S₂O₈, larutan DPPH, larutan ABTS, etanol p.a, etanol absolut, dan vitamin C

Prosedur Kerja

Pembuatan Ekstrak

Simplisia daun beroma dimasukkan kedalam toples kemudian dibasahi menggunakan pelarut etanol 70% dengan metode maserasi, diaduk hingga terbasahi sempurna lalu ditutupi menggunakan aluminium foil dan didiamkan selama 3 hari yang terlindungi dari cahaya matahari sambil sesekali diaduk, setelah itu disaring. Dipisahkan filtrat dan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental.

Masuk 27-03-2019

Revisi 25-04-2019

Diterima 30-04-2019

Korespondensi

Mirrawati Salampe

mirnachamto@gmail.com

Copyright

© 2019 Majalah Farmasi

Farmakologi Fakultas

Farmasi · Makassar

Diterbitkan tanggal

30-04-2019

Dapat Diakses Daring

Pada:

<http://journal.unhas.ac.id>

[/index.php/mff](http://journal.unhas.ac.id/index.php/mff)



Pembuatan Larutan ABTS

Larutan stok ABTS dibuat dengan cara (A) Larutan a : ditimbang 36 mg ABTS, dilarutkan dalam 10 mL aquadest; (B) Larutan b : ditimbang 7 mg K₂S₂O₈, dilarutkan dalam 10 mL aquadest; (C) Larutan a dan b dicampur dalam ruang gelap dan dicukupkan volumenya dengan etanol pro analisa, kemudian di inkubasi selama 14 jam

Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Daun Beroma Metode DPPH

Larutan stok 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 50 mg masing-masing ekstrak daun beroma dan dilarutkan dengan etanol sambil dihomogenkan, volume akhir dicukupkan dengan menambahkan etanol sampai 50 mL dalam labu ukur. Dari larutan stok 1000 ppm dipipet masing-masing sebanyak 250 µL, 375 µL, 500 µL, 625 µL dan 750 µL dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL, sehingga diperoleh konsentrasi 50 ppm, 75 ppm, 60 ppm, 125 ppm dan 150 ppm.

Pembuatan Larutan Standar Vitamin C Murni Metode DPPH

KHM ditentukan dengan metode mikrodilusi. Ke dalam Larutan stok 1000 ppm disiapkan dengan cara menimbang 50 mg vitamin C murni dan dilarutkan dengan aquades, volume akhir dicukupkan dengan aquades 50 mL. Dari larutan stok dipipet 1 mL kemudian dicukupkan dengan aquades 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari larutan 100 ppm dipipet masing-masing 100 µL, 200 µL, 300 µL, 400 µL dan 500 µL, dan dicukupkan volumenya hingga 5 mL sehingga diperoleh konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm.

Pengukuran Serapan Larutan Blanko DPPH

Larutan DPPH 0,4 mM dipipet sebanyak 1 mL dan ditambahkan etanol absolut sebanyak 4 mL dalam labu ukur. Larutan ini kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit selanjutnya dilakukan pengukuran 5 serapan dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis pada panjang gelombang 500-600 nm hingga diperoleh panjang gelombang maksimum 516 nm

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Beroma Dengan Radikal Bebas DPPH

Pengujian dilakukan dengan memipet masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun beroma (20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm) sebanyak 1 mL kemudian ditambahkan 1 mL larutan pereaksi DPPH dimasukkan kedalam vial lalu dicukupkan volumenya hingga 5 mL dengan metanol absolut dan homogenkan. Campuran larutan dibiarkan selama 30 menit, selanjutnya serapannya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Vitamin C Murni dengan Radikal Bebas DPPH

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL dari berbagai konsentrasi larutan vitamin C (2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm), masing-masing dimasukkan kedalam vial lalu ditambahkan 1 mL pereaksi DPPH lalu dicukupkan 5 mL metanol absolut dan dihomogenkan. Campuran didiamkan selama 30 menit ditempat gelap, serapan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm.

Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Radikal ABTS

Larutan stok sampel ekstrak daun beroma 1000 ppm di pipet masing-masing 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL dan 60 µL campuran masing-masing ditambah 1 mL larutan ABTS lalu

dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol 96% sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm dan 300 ppm. Selanjutnya larutan dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang 752 nm.

Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal Bebas ABTS Dengan Pembandingan Vitamin C

Larutan stok vitamin C 1000 ppm di encerkan 200 ppm, kemudian dipipet masing-masing 200 µL, 250 µL, 300 µL, 350 µL dan 400 µL, campuran masing-masing ditambah 1 mL larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan etanol pro analisis sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1 ppm, 1,25 ppm, 1,5 ppm, 1,75 ppm dan 2 ppm. Selanjutnya larutan dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 752 nm.

Pengumpulan Data

Data dikumpulkan dari hasil pengujian antioksidan ekstrak daun beroma menggunakan metode DPPH dan ABTS berupa hasil pengukuran absorbansi serapan spektrofotometer UV-Vis dan spektrofotometer.

Analisis Data

Besarnya persentase pengikatan radikal bebas DPPH dan ABTS dihitung berdasarkan rumus;

$$\% \text{Pengikatan radikal} = \frac{(\text{Abs Blanko} - \text{Abs Sampel})}{\text{Abs Blanko}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ (50% Inhibitory Concentration) ditentukan dengan analisis probit dari data log konsentrasi dengan probit persentase pengikatan radikal bebas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian aktivitas antioksidan daun beroma dilakukan menggunakan metode DPPH dan ABTS. Uji aktivitas antioksidan metode DPPH berdasarkan hilangnya warna ungu akibat terinduksinya DPPH oleh antioksidan. Intensitas warna ungu yang hilang diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 520 nm. Sedangkan uji aktivitas antioksidan dengan metode ABTS berdasarkan hilangnya warna biru akibat tereduksinya ABTS oleh antioksidan. Intensitas warna biru ini diukur pada panjang gelombang 752 nm. Berkurangnya intensitas warna pada metode DPPH dan ABTS dikaitkan dengan kemampuan senyawa mendonorkan atom hidrogen. Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas.

Tabel 1. Nilai IC₅₀ Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Beroma Terhadap Radikal DPPH

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Inhibisi (%)	Log konsentrasi	Probit	IC ₅₀ (ppm)
Ekstrak etanol daun beroma	50	28,02	1,70	4,42	86,34
	75	42,88	1,88	4,82	
	100	57,08	2,00	5,18	
	125	63,40	2,10	5,34	
	150	74,58	2,18	5,66	
Blanko		0,897			

Metode DPPH secara luas digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan pada senyawa fenolik yang terkandung pada bahan alam, namun metode ini sangat sensitive pada kondisi pH asam dan kehadiran senyawa antosianin dapat mengganggu hasil pengukuran antioksidan suatu senyawa. Sedangkan metode ABTS dapat digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan beberapa senyawa, dapat

digunakan pada berbagai level pH dan ABTS larut dalam air dan pelarut organik (6,7)

Hasil pengukuran daya antioksidan ekstrak etanol daun beroma menggunakan metode DPPH dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 2. Nilai IC₅₀ Aktivitas Antioksidan Vitamin C Terhadap Radikal DPPH

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Nilai	Inhibisi (%)	Log konsentrasi	Probit	IC ₅₀ (ppm)
Vit. C	1	0,755	6,56	0,00	3,49	3,20
	1,5	0,647	19,93	0,18	4,16	
	2	0,614	24,01	0,30	4,29	
	2,5	0,504	37,62	0,40	4,68	
	3	0,426	47,28	0,48	4,93	
	3,5	0,375	53,59	0,54	5,09	
	4	0,306	62,13	0,60	5,31	
Blanko	0,808					

Data pada tabel 1. Menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beroma mempunyai aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 86,34 µg/mL sedangkan nilai IC₅₀ vitamin C (**Tabel 2**) sebagai pembanding yaitu 3,20 µg/mL. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin kuat daya antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beroma mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dengan tingkat intensitas antioksidan dalam rentang nilai IC₅₀ 50-100 µg/mL.

Tabel 3. Nilai IC₅₀ Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Beroma Terhadap Radikal ABTS

Sampel	Konsentrasi (bpj)	Inhibisi (%)	Log Konsentrasi	Probit	IC ₅₀ (bpj)
Daun	10	29,56	1,00	4,47	20,53
	20	38,57	1,30	4,71	
	30	53,46	1,48	5,09	
	40	75,63	1,60	5,7	
	50	88,19	1,70	6,19	
	60	99,56	1,78	6,41	
Blanko					

Tabel 4. Nilai IC₅₀ Aktivitas Antioksidan Vitamin C Terhadap Radikal ABTS

Sampel	Konsentrasi (bpj)	Nilai	Inhibisi (%)	Log konsentrasi	Probit	IC ₅₀ (bpj)
Vit. C	1	0,650	13,33	0,00	3,89	1,69
	1,25	0,530	29,33	0,10	4,46	
	1,5	0,428	42,93	0,18	4,21	
	1,75	0,323	56,93	0,24	5,18	
	2	0,165	78,00	0,30	5,77	
	Blanko	0,75				

Data pada **Tabel 3** menunjukkan ekstrak etanol daun beroma mempunyai nilai IC₅₀ 20,53 µg/mL dan vitamin C murni

(**Tabel 4**) sebagai pembanding mempunyai nilai IC₅₀ 1,69 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beroma mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dengan intensitas antioksidan dalam rentang nilai IC₅₀ < 50 µg/mL.

Ekstrak etanol 70% daun beroma (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat dikaitkan dengan beberapa senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Studi menunjukkan bahwa *Cajanus cajan* (L.) Millsp mempunyai kandungan senyawa flavanoid, asam cajaninstilbene (3-hydroxy-4-prenylmethoxystilbene-2-asam karboksil), pinostrobin, vitexin dan orientin (5). Senyawa flavanoid mempunyai kemampuan untuk meredam radikal bebas melalui beberapa mekanisme yaitu, secara langsung meredam radikal bebas (scavenger free radical) dengan mendonorkan atom hidrogen, membentuk ikatan khelat dengan metal seperti Fe²⁺ dan Cu⁺ sehingga mencegah metabolisme oksigen dan pembentukan radikal. Selain itu, flavonoid menghambat enzim yang menghasilkan radikal bebas seperti, xanthine oxidase, lipoxygenase, protein kinase C, cyclooxygenase, microsomal monooxygenase, mitochondrial succinoxidase, dan NADPH oxidase (8). Sedangkan senyawa fenolik Fenol sangat efektif sebagai penangkal radikal peroksid karena struktur molekulnya meliputi cincin aromatik dengan gugus hidroksil yang mengandung mobile hydrogen. Senyawa fenolik mempunyai kemampuan untuk mereduksi dan membentuk ikatan khelat dengan ion ferri (9)

KESIMPULAN

Nilai IC₅₀ pada pengujian metode DPPH yaitu 86,34 mg/ml dan IC₅₀ pada metode ABTS yaitu 20,53 mg/ml. Berdasarkan nilai IC₅₀ tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *Cajanus cajan* (L.) Milps mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat

DAFTAR PUSTAKA

- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals , antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8).
- Deavall DG, Martin EA, Horner JM, Roberts R. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Toxicol.* 2012;2012.
- Bouayed J, Bohn T. Exogenous antioxidants — Double-edged swords in cellular redox state Health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. *Oxid Med Cell Longev.* 2010;3(4):228–37.
- Mironczuk-Chodakowska I, Maria A., Witkowska ME _zbieta Z. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body Iwona. *Adv Med Sci J.* 2018;63:68–78.
- Wu N, Fu K, Fu Y, Zu Y, Chang F, Chen Y, et al. Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *Molecules.* 2009;14:1032–43.
- Shalaby EA, Shanab SMM. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian J Geo-Marine Sci.* 2013;42(September):556–64.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-woodill, M., Judith A. Flanagan & EKD. Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: *J Agric Food Chem.* 2002;50(1):3122–8.
- Banjarnahor SDS, Artanti N. Antioxidant properties of flavonoids. *Med J Indones.* 2014;23(4):239–44.
- Uttara B, Singh A V, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative Stress and Neurodegenerative Diseases: A Review of Upstream and Downstream Antioxidant Therapeutic Options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65–74.