

# Identifikasi Golongan Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee)

Lia Puspitasari<sup>1\*</sup>, Laode Rijai<sup>2</sup>, Herman<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Farmasi ISTN, Jl. M.Kahfi II, Jagakarsa, Jakarta Selatan

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Jl. Penajam, Kampus Unmul Gunung Kelua, Samarinda

\*E-mail korespondensi: lia.puspitasari@istn.ac.id

## ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan metabolit sekunder, aktivitas antioksidan, nilai IC<sub>50</sub>, ekstrak yang memiliki aktivitas terbaik sebagai antioksidan, serta mengetahui potensi antioksidan daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) yang dibandingkan dengan kontrol positif (vitamin C). Penelitian ini menggunakan metode peredaman radikal bebas 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH), yang diujikan pada ekstrak kasar metanol (konsentrasi 50, 150, dan 250 ppm), ekstrak fraksi n-heksana (konsentrasi 300, 500, dan 700 ppm), dan ekstrak fraksi etil asetat (konsentrasi 100, 200, dan 300 ppm) daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee), serta kontrol negatif (pelarut metanol), dan kontrol positif (vitamin C). Hasil identifikasi golongan metabolit sekunder pada ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi etil asetat yaitu alkaloid, karotenoid, fenol, tanin, steroid dan triterpenoid. Sementara pada ekstrak fraksi n-heksana yaitu alkaloid, karotenoid, steroid dan triterpenoid. Nilai IC<sub>50</sub> masing-masing sampel antara lain: ekstrak kasar metanol 184,76 ppm; ekstrak fraksi n-heksana 1173,40 ppm; ekstrak fraksi etil asetat 910,60 ppm. Hasil pengujian aktivitas antioksidan diketahui bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik adalah ekstrak kasar metanol pada konsentrasi 250 ppm. Pada pengujian potensi diperoleh kesimpulan bahwa potensi antioksidan ekstrak kasar metanol daun brotowali tidak berbeda nyata dengan vitamin C.

**Kata Kunci :** antioksidan, brotowali, DPPH, metabolit sekunder

## Secondary Metabolite Group Identification and Antioxidant Activity of Brotowali Leaf Extract (*Tinospora tuberculata* Beumee)

### ABSTRACT

This research aims to determine the secondary metabolites compounds, antioxidant activity, IC<sub>50</sub> value, extracts that have the best activity as antioxidants, and determine the antioxidant potential of leaves of brotowali compared with positive control (vitamin C). This research uses the method of reducing free radicals 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazyl (DPPH), which was tested on crude extracts of methanol (50, 150, and 250 ppm), n-hexane fraction extracts (300, 500, and 700 ppm), and ethyl acetate fraction extracts (100, 200, and 300 ppm) of the brotowali leaf (*Tinospora tuberculata* Beumee), negative controls (methanol solvents), and positive control (vitamin C). The result of identification secondary metabolites compounds in crude methanol extract and etil acetat fraction were alkaloid, carotenoids, phenols, tannins, steroids and triterpenoids. While the extracts of the n-hexane fraction are alkaloids, carotenoids, steroids and triterpenoids. The IC<sub>50</sub> value from brotowali's leaves extract were: 184.76 ppm in crude extract; 1173.40 ppm in ethyl acetate fraction; and 910.60 ppm in n-hexane fraction. From testing antioxidant activity, it was known that the extract which has the best antioxidant activity was crude extract of methanol at a concentration of 250 ppm. In the potential test, it was concluded that the antioxidant potential of brotowali leaf methanol extract was not significantly different from vitamin C.

**Keywords :** antioxidant, brotowali, DPPH, secondary metabolites

## PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat radikal bebas. Antioksidan diperlukan untuk mencegah stres oksidatif. Stres oksidatif adalah

kondisi ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas yang ada dengan jumlah antioksidan di dalam tubuh. Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbitalnya, sehingga bersifat sangat reaktif dan mampu

mengoksidasi molekul di sekitarnya (lipid, protein, DNA, dan karbohidrat). Antioksidan bersifat sangat mudah dioksidasi, sehingga radikal bebas akan mengoksidasi antioksidan dan melindungi molekul lain dalam sel dari kerusakan akibat oksidasi oleh radikal bebas atau oksigen reaktif (Asri, 2014).

Salah satu tumbuhan asli Indonesia yang dapat berfungsi sebagai obat tradisional adalah brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) yang memiliki rasa pahit. Tumbuhan brotowali kaya kandungan kimia yang bermanfaat untuk proses pengobatan, salah satunya adalah alkaloid. Berdasarkan berbagai literatur dan catatan pengalaman yang turun temurun dari berbagai negara dan daerah, tanaman ini dapat menyembuhkan berbagai penyakit. Diperkirakan tumbuhan ini mempunyai prospek yang baik sebagai antikanker. Antikanker sangat erat kaitannya dengan radikal bebas, karena adanya radikal bebas dalam tubuh dapat menjadi salah satu penyebab penyakit kanker. Karena manfaatnya yang besar inilah, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui potensi antioksidan ekstrak daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) dengan menggunakan metode DPPH.

## METODOLOGI PENELITIAN

**Bahan.** Bahan yang diteliti adalah tumbuhan brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee). Bagian yang diteliti adalah daunnya. Bahan penelitian lain nya yaitu ; metanol, n-heksana, etil asetat, DPPH, vitamin C, akuades, bismut nitrat, merkuri klorida, asam nitrat, raksa klorida, kalium iodida, asam sulfat pekat, asam asetat, kloroform, besi klorida, kalium heksasianoferat (III), magnesium klorida, asam klorida pekat, natrium klorida, dan natrium hidroksida.

### Metode.

**Penyiapan Sampel.** Sampel berupa daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) yang bersih dan bebas dari kotoran dicuci dengan air bersih dan dikering-anginkan di udara terbuka dalam ruangan. Daun brotowali diletakkan di atas alas kertas kemudian dikeringkan hingga diperoleh bentuk simplisianya. Daun brotowali dirajang untuk memperluas permukaan simplisia. Simplisia kering yang telah dirajang lalu ditimbang bobot akhirnya. Setelah dilakukan penimbangan, diperoleh 286 g simplisia kering daun brotowali.

**Ekstraksi (Maserasi).** Simplisia kering yang telah dirajang dimasukkan ke dalam wadah kaca, kemudian direndam dengan pelarut metanol selama 2 x 24 jam. Pelarut hasil ekstraksi disaring dan ditampung ke dalam wadah kaca, kemudian sisa simplisia kering daun brotowali kembali direndam dengan pelarut metanol. Proses diulangi hingga sisa pelarut hasil ekstraksi bening. Hasil maserasi kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak menyerupai sirup kental. Ekstrak

kental yang diperoleh kemudian diuapkan di atas *waterbath* dan di dalam desikator hingga didapatkan ekstrak kasar metanol sebanyak 79 g.

**Fraksinasi.** Ekstrak kasar metanol hasil maserasi selanjutnya difraksinasi dengan dua macam pelarut yang berbeda sesuai dengan tingkat kepolarannya. Proses ini menggunakan metode fraksinasi padat-cair. Pelarut yang pertama adalah pelarut yang lebih non polar dibandingkan kedua pelarut lainnya, yaitu n-heksana. Setelah dilakukan pengadukan dengan bantuan *stirer* dan diuapkan sisa pelarutnya, diperoleh ekstrak fraksi n-heksana sebanyak 3,82 g. Sisa ekstrak kasar metanol yang telah difraksinasi dengan n-heksana tersebut selanjutnya dicampurkan kembali dengan pelarut kedua yaitu etil asetat, dan diperoleh ekstrak fraksi etil asetat sebanyak 2,56 g. Ekstrak fraksi n-heksana dan etil asetat inilah yang akan digunakan pada pengujian metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan, beserta dengan ekstrak kasar metanol daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee).

### Identifikasi Golongan Metabolit Sekunder.

Identifikasi golongan metabolit sekunder dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee), terutama yang memiliki aktivitas antioksidan.

- a) **Identifikasi Alkaloid.** Senyawa alkaloid dideteksi dengan pereaksi Dragendorff dan Mayer. Ekstrak daun brotowali dilarutkan dalam 1,5 mL asam klorida 2% dan ditambahkan pereaksi Mayer. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan. Selain itu, identifikasi juga dapat menggunakan pereaksi Dragendorff, dan reaksi positifnya ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga coklat.
- b) **Identifikasi Steroid & Triterpenoid.** Ekstrak daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Timbul warna ungu atau merah kemudian berubah menjadi biru hijau menunjukkan adanya steroid dan triterpenoid.
- c) **Identifikasi Karotenoid.** Lebih kurang 1 mL ekstrak daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) ditambahkan dengan larutan asam sulfat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau kebiruan.
- d) **Identifikasi Flavanoid.** Ekstrak daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) ditambahkan dengan metanol 50%, kemudian dipanaskan. Selanjutnya dimasukkan logam Mg hingga larut, dan ditambahkan HCl. Reaksi positif jika terjadi warna merah, kuning, atau jingga.

- e) **Identifikasi Senyawa Fenol.** Untuk mendeteksi senyawa fenol sederhana ialah dengan menambahkan larutan besi (III) klorida 1% dalam air dan etanol ke dalam larutan cuplikan, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.
- f) **Identifikasi Tanin.** Ekstrak daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) diencerkan dengan 2 mL air. Ditambahkan 3 tetes larutan besi (III) klorida. Diamati perubahan yang terjadi, warna larutan akan berubah menjadi biru kehitaman (untuk tanin galat) atau hijau kehitaman (untuk tanin katekol).

### Pengujian Antioksidan

- a) **Penyiapan Larutan DPPH.** DPPH (4,0 mg) dilarutkan dalam metanol sampai 100 mL, sehingga didapat larutan 0,004% (40,0 ppm). Larutan dijaga pada suhu rendah, terlindungi dari cahaya untuk segera digunakan.
- b) **Penentuan Seri Konsentrasi Uji.** Penentuan seri konsentrasi dilakukan melalui serangkaian uji pendahuluan, dimana akan ditetapkan batas atas dan batas bawah konsentrasi ekstrak daun brotowali yang akan diuji aktivitas antioksidannya. Tahap pertama adalah pembuatan larutan stok masing-masing ekstrak dengan konsentrasi 1.000 ppm (10 mg ekstrak dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL). Selanjutnya adalah pembuatan 10 seri konsentrasi dari 20 ppm hingga 200 ppm dengan *range* konsentrasi sebesar 20 ppm. Setelah itu, ditetapkan konsentrasi 50 ppm, 150 ppm, dan 250 ppm sebagai konsentrasi dalam pengujian aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol. Konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm untuk ekstrak fraksi etil asetat. Konsentrasi 300 ppm, 500 ppm, dan 700 ppm untuk ekstrak fraksi n-heksana. Masing-masing konsentrasi tersebut dilakukan tiga kali pengulangan (replikasi) dalam pengujian aktivitas antioksidan. Begitu pula dengan kontrol positif (vitamin C), dibuat empat seri konsentrasi, yaitu 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm, dan 10 ppm. Masing-masing konsentrasi dilakukan tiga kali replikasi dan satu sebagai kontrol negatif menggunakan pelarut metanol (tanpa penambahan ekstrak). Untuk kontrol positif ditetapkan konsentrasi 2,5 ppm, 5 ppm, dan 7,5 ppm yang digunakan dalam perhitungan nilai  $IC_{50}$ .
- c) **Uji Antioksidan.** Dibuat serangkaian larutan sampel dari ekstrak kasar metanol, ekstrak fraksi n-heksana, dan ekstrak fraksi etil asetat dengan tiga kali replikasi menggunakan pelarut metanol. Masing-masing larutan ditambah 2 mL larutan DPPH, sehingga diperoleh serangkaian larutan dengan konsentrasi yang telah ditentukan sebelumnya, didiamkan selama 30 menit (dihitung setelah penambahan larutan DPPH), diukur absorbansinya pada  $\lambda$  517 nm. Data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk

menentukan % inhibisi (peredaman). Melalui kurva % inhibisi versus konsentrasi sampel, dapat diperoleh nilai  $IC_{50}$  ekstrak dengan analisis statistik menggunakan regresi linear. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko (metanol). Hasil penetapan antioksidan selanjutnya dianalisis dengan ANAVA satu arah dan uji lanjutan BNT untuk menentukan ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik. Sementara nilai  $IC_{50}$  masing-masing sampel juga akan dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  vitamin C untuk mengetahui potensi antioksidan daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee).

**Teknik Analisis Data.** Teknik analisis data dalam penelitian ini dapat diuraikan sebagai berikut :

- Data golongan metabolit sekunder dianalisis dengan menggunakan analisis deskriptif.
- Data antioksidan dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan nilai peredaman DPPH oleh ekstrak dan kontrol. Selanjutnya dihitung nilai  $IC_{50}$  sebagai konsentrasi larutan uji yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50%.
- Penentuan ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik dianalisis dengan menggunakan analisis varian (ANAVA) satu arah. Karena hasil analisis menunjukkan bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel, maka terdapat perbedaan yang berarti atau signifikan antara konsentrasi ekstrak uji terhadap aktivitas antioksidan. Kemudian dilakukan uji lanjutan dengan metode BNT untuk mengetahui ekstrak manakah yang paling efektif.
- Potensi antioksidan daun brotowali (*Tinospora tuberculata* Beumee) antar ekstrak sampel dianalisis dengan menggunakan uji-t.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dimulai dengan penyiapan ekstrak daun brotowali dengan metode maserasi. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut metanol. Keuntungan maserasi adalah cara kerja dan peralatan yang digunakan relatif sederhana, selain itu metode ini tidak akan merusak senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan (Departemen Kesehatan RI, 1986). Hasil ekstraksi diperoleh ekstrak kasar metanol sebanyak 79 g dengan persentase rendemen sebanyak 27,62% terhadap simplisia kering daun brotowali. Ekstrak kasar metanol yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan menggunakan pelarut n-heksana dan etil asetat dengan metode fraksinasi padat cair. Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain. Metode fraksinasi yang digunakan adalah fraksinasi padat-cair. Diperoleh ekstrak fraksi n-heksana sebesar 3,82 g serta ekstrak fraksi etil asetat sebanyak 2,56 g. Berikut merupakan data perolehan ekstrak beserta rendemennya (Tabel 1):

**Tabel 1.** Rendemen Sampel Uji

No	Sampel	Berat Sampel (g)	Rendemen I (%)	Rendemen II (%)
1	Ekstrak Kasar Metanol	79	27,62	-
2	Ekstrak Fraksi N-Heksana	3,82	1,34	32,80
3	Ekstrak Fraksi Etil Asetat	2,56	0,90	25,60

Keterangan:

Rendemen I : Terhadap simplisia kering

Rendemen II : Terhadap ekstrak kasar metanol

### 1. Golongan Metabolit Sekunder Daun Brotowali

Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa tidak esensial bagi pertumbuhan tanaman. Senyawa metabolit sekunder dihasilkan dalam jumlah berlebih oleh tanaman pada keadaan tertentu. Senyawa ini unik dan berbeda pada setiap spesies. Berbagai jenis tanaman mampu menghasilkan senyawa metabolit

sekunder pada keadaan tertentu (Setyorini & Yusnawan, 2016). Golongan senyawa metabolit sekunder yang diuji yaitu flavanoid, alkaloid, senyawa fenol, karotenoid, tanin, steroid, dan triterpenoid. Tabel 2 menunjukkan hasil kualitatif pengujian metabolit sekunder ekstrak daun brotowali.

**Tabel 2.** Hasil Identifikasi Golongan Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Brotowali

No	Pengujian Metabolit Sekunder	Hasil		
		Ekstrak Kasar Metanol	Ekstrak Fraksi Etil Asetat	Ekstrak Fraksi n-heksana
1	Flavanoid	-	-	-
2	Alkaloid	+	+	+
3	Senyawa Fenol	+	+	-
4	Tanin	+	+	-
5	Karatenoid	+	+	+
6	Steroid dan Triterpenoid	+	+	+

Keterangan :

+ (positif) terdeteksi

- (negatif) tidak terdeteksi

Pada identifikasi golongan metabolit sekunder tersebut, diperoleh hasil bahwa alkaloid, karotenoid, steroid, dan triterpenoid terdeteksi pada semua ekstrak uji. Hal ini berarti bahwa golongan senyawa-senyawa tersebut tersebar ke dalam seluruh ekstrak. Sementara untuk tanin dan senyawa fenol hanya terdeteksi pada ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi etil asetat, hal ini berarti golongan senyawa fenol dan tanin yang terdeteksi dalam ekstrak kasar metanol bersifat polar dan golongan senyawa fenol dan tanin yang terdeteksi dalam ekstrak fraksi etil asetat bersifat semi polar. Kemudian untuk flavanoid tidak terdeteksi pada semua ekstrak uji.

Senyawa metabolit sekunder yang terdapat di dalam suatu tumbuhan dapat digolongkan ke dalam antioksidan non-enzimatis atau antioksidan alami, tentu saja bila senyawa tersebut menunjukkan aktivitas peredaman terhadap radikal bebas. Antioksidan non-enzimatis banyak ditemukan dalam sayuran dan buah-buahan. Senyawa karotenoid, alkaloid, fenol, tanin,

steroid, dan triterpenoid telah diketahui juga memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Adanya senyawa tersebut di dalam ekstrak daun brotowali menunjukkan bahwa tumbuhan tersebut diduga memang memiliki kemampuan sebagai penghambat radikal bebas.

Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus -OH dan -OR (Riza *et al.*, 2015). Alkaloid berfungsi sebagai antioksidan karena mengandung atom nitrogen di dalam strukturnya, atom tersebut mempunyai pasangan elektron bebas yang berfungsi untuk meredam aktivitas radikal bebas di dalam tubuh. Senyawa radikal bebas di dalam tubuh dapat merusak asam lemak tak jenuh ganda pada membran sel yang mengakibatkan dinding sel menjadi rapuh. Senyawa radikal bebas ini berpotensi merusak DNA sehingga mengacaukan sistem info genetika dan

berlanjut pada pembentukan sel kanker. Jaringan lipid juga akan dirusak oleh senyawa radikal bebas sehingga terbentuk peroksida yang memicu munculnya penyakit degeneratif (Winarsi, 2013). Oleh sebab itu, peran atom nitrogen sebagai antioksidan juga dapat dikaitkan dengan fungsi senyawa alkaloid sebagai antikanker.

## 2. Aktivitas Antioksidan Daun Brotowali

Antioksidan adalah senyawa yang memiliki peranan penting dalam menjaga kesehatan karena dapat menangkap molekul radikal bebas sehingga menghambat reaksi oksidatif dalam tubuh yang merupakan penyebab berbagai penyakit (Adawiah *et al.*, 2015). Senyawa radikal bebas dapat berinteraksi dengan tubuh dan mengakibatkan berbagai penyakit seperti jantung koroner, penuaan dini dan kanker. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Dewi *et al.*, 2013).

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif menggunakan metode DPPH adalah adanya perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan

akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning. Perubahan warna ini akan memberikan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai  $IC_{50}$  (*Inhibitory concentration*). Nilai  $IC_{50}$  didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi (Rizkayanti *et al.*, 2017). Perubahan warna dari ungu ke kuning tersebut juga diikuti oleh penurunan nilai absorbansi, semakin banyak radikal yang diredam maka nilai absorbansinya semakin kecil. Absorbansi tersebut yang kemudian dihitung untuk mendapatkan % aktivitas antioksidan. Berikut merupakan data pengujian aktivitas antioksidan ekstrak daun brotowali secara keseluruhan (Tabel 3):

**Tabel 3.** Data Pengujian Antioksidan

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Aktivitas Antioksidan (%)
1	Ekstrak Kasar Metanol	50	19,26
		150	47,05
		250	60,84
2	Ekstrak Fraksi N-Heksana	300	7,49
		500	12,92
		700	27,09
3	Ekstrak Fraksi Etil Asetat	100	8,67
		200	17,62
		300	19,45
4	Kontrol Negatif (DPPH + Metanol)	0	0

Berdasarkan Tabel 3 dapat dilihat bahwa aktivitas antioksidan terus meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi. Pada ekstrak kasar metanol aktivitas yang tertinggi ada pada konsentrasi 250 ppm, pada ekstrak fraksi n-heksana pada konsentrasi 700 ppm, dan pada ekstrak fraksi etil asetat pada konsentrasi 300 ppm. Dalam penelitian ini, secara kualitatif ketiga ekstrak juga menunjukkan perubahan warna. Pada ekstrak kasar metanol perubahan warna yang dihasilkan lebih jelas, yaitu dari ungu pekat menjadi kuning cerah. Sementara pada ekstrak fraksi etil asetat masih terlihat sedikit warna ungu muda, dan pada ekstrak fraksi n-heksana warna ungu juga masih dapat terlihat, bahkan cenderung lebih pekat dibandingkan perubahan pada ekstrak fraksi etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kasar metanol lebih besar dibandingkan dengan ekstrak fraksi n-heksana dan ekstrak fraksi etil asetat.

### a. Ekstrak Yang Memberikan Aktivitas Antioksidan Terbaik

Nilai  $IC_{50}$  merupakan parameter yang digunakan untuk melihat aktivitas antioksidan suatu sampel yang dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Besarnya peredaman radikal DPPH oleh ekstrak dapat diketahui melalui pengukuran absorbansi dengan menggunakan instrumen spektrofotometri. Berikut merupakan data nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun brotowali (Tabel 4).

**Tabel 4.** Data Nilai  $IC_{50}$  Ekstrak Daun Brotowali

No	Sampel	Nilai $IC_{50}$
1	Ekstrak Kasar Metanol	184,76
2	Ekstrak Fraksi N-Heksana	1173,40
3	Ekstrak Fraksi Etil Asetat	910,60

Melalui data tersebut (Taabel 4), dapat diketahui bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik adalah pada ekstrak kasar metanol. Semakin rendah nilai  $IC_{50}$ , maka aktivitas antioksidannya akan semakin besar. Selain berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , pengujian ini juga dilakukan dengan menggunakan analisis data ANAVA satu arah untuk mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi terhadap aktivitas antioksidan yang dihasilkan. Kemudian dilanjutkan dengan uji lanjutan yang sesuai untuk menentukan ekstrak yang memberikan aktivitas antioksidan terbaik. Melalui perhitungan ANAVA diperoleh hasil bahwa  $F_{hitung}$  (14025,43) lebih besar dari pada  $F_{tabel}$  (2,51 untuk 5%; 3,71 untuk 1%) dengan KK sebesar 5,35%, sehingga dilakukan uji lanjutan dengan metode BNT (Beda Nyata Terkecil) dan diperoleh hasil bahwa ekstrak daun brotowali yang memberikan aktivitas antioksidan terbaik terdapat pada ekstrak kasar metanol dengan konsentrasi terbaik pada saat pengujian adalah 250 ppm.

Hal ini juga didukung dari identifikasi golongan metabolit sekunder, dimana telah diperoleh hasil bahwa pada ekstrak kasar metanol dideteksi banyak

mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan, antara lain alkaloid, fenol, tanin, karotenoid, steroid, dan triterpenoid. Diduga senyawa-senyawa yang terdapat di dalam daun brotowali bersifat sinergis, yaitu memberikan efek yang lebih baik sebagai antioksidan ketika masih bersatu di dalam ekstrak kasar, sementara aktivitas antioksidannya akan menurun ketika telah dipisahkan berdasarkan kepolarannya dalam bentuk ekstrak fraksi.

#### b. Potensi Antioksidan Daun Brotowali

Penentuan potensi antioksidan daun brotowali dilakukan dengan membandingkan nilai aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak dengan aktivitas antioksidan vitamin C. Cara tersebut dilakukan dengan menggunakan analisis data uji-t. Selain cara tersebut, potensi antioksidan juga dapat diketahui melalui nilai  $IC_{50}$  sampel dan vitamin C yang bertindak sebagai kontrol positif. Berikut merupakan data aktivitas antioksidan dan nilai  $IC_{50}$  seluruh sampel beserta vitamin C (Tabel 5):

**Tabel 5.** Data Aktivitas Antioksidan dan nilai  $IC_{50}$

No	Sampel	Konsentrasi (ppm)	Rata-Rata Aktivitas Antioksidan (%)	$IC_{50}$ (ppm)
1	Ekstrak Metanol	50	19,26	184,76
		150	47,05	
		250	60,84	
2	Ekstrak Fraksi Etil Asetat	100	7,49	910,60
		200	12,92	
		300	27,09	
3	Ekstrak Fraksi n-heksana	300	8,67	1173,40
		500	17,62	
		700	19,45	
		2,50	27,12	
4	Vitamin C	5,00	43,27	6,15
		7,50	58,23	

Masing-masing ekstrak sampel dibandingkan aktivitas antioksidannya terhadap vitamin C dengan menggunakan analisis uji-t. Diperoleh hasil bahwa antara ekstrak kasar metanol pada konsentrasi 250 ppm tidak berbeda nyata dengan vitamin C pada konsentrasi 7,5 ppm. Artinya adalah ekstrak kasar metanol daun brotowali pada konsentrasi 250 ppm memiliki potensi yang sama dengan vitamin C pada konsentrasi 7,5 ppm sebagai antioksidan. Namun hasil yang berbeda diperoleh dari pengujian pada ekstrak fraksi n-heksana konsentrasi 700 ppm dan ekstrak fraksi etil asetat konsentrasi 300 ppm, kedua ekstrak fraksi tersebut memiliki potensi antioksidan yang berbeda nyata dengan vitamin C pada konsentrasi 7,5 ppm.

Potensi antioksidan daun brotowali juga dapat dilihat dari perbandingan nilai  $IC_{50}$  masing-masing. Molyneux (2004) menyatakan bahwa suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai  $IC_{50}$  kurang dari 200 ppm. Bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh berkisar antara 200-1.000 ppm, maka zat tersebut kurang aktif namun

masih berpotensi sebagai zat antioksidan. Berdasarkan teori tersebut, maka dapat disimpulkan bahwa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dari daun brotowali adalah ekstrak kasar metanol. Masing-masing nilai  $IC_{50}$  ekstrak kemudian dibandingkan dengan nilai  $IC_{50}$  vitamin C. Melihat nilai tersebut, dapat disimpulkan pula bahwa aktivitas antioksidan vitamin C masih lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak daun brotowali.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dapat disimpulkan bahwa golongan metabolit sekunder yang terdapat di dalam ekstrak kasar metanol dan ekstrak fraksi etil asetat daun brotowali yaitu alkaloid, fenol, karotenoid, tanin, steroid dan triterpenoid. Sedangkan pada ekstrak fraksi n-heksana yaitu alkaloid, karotenoid, steroid dan triterpenoid. Ekstrak daun brotowali memiliki aktivitas antioksidan ketika diuji dengan menggunakan metode

peredaman DPPH. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak daun brotowali adalah sebagai berikut: ekstrak kasar metanol yaitu 184,76 ppm; ekstrak fraksi etil asetat yaitu 910,60 ppm; ekstrak fraksi n-heksana yaitu 1173,40 ppm. Berdasarkan tiga jenis ekstrak uji, maka ekstrak daun brotowali yang memiliki aktivitas antioksidan terbaik adalah ekstrak kasar metanol.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adawiah, Dede Sukandar, Anna Muawanah. (2015). Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Komponen Bioaktif Sari Buah Namnam. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Ilmu Kimia*, 1(2), 130-133.
- Asri Werdhasari. (2014). Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biotek Medisiana Indonesia*, 3(2), 59-68.
- Departemen Kesehatan RI. (1986). *Sediaan Galenik*. DIRJEN POM. Jakarta.
- Dewi T, Mimin Kusmiyati, Fitri Retna Wijayanti. (2013). Uji Aktivitas Daya Antioksidan Buah Rambutan Rapih dengan Metode DPPH. *Jurnal UIN Sunan Gunung Djati*. 7(1).
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26(2), 211-219.
- Riza M, Afrinaldi, Ari. (2015). Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura L.*). *Jurnal Kedokteran Yarsi* 23(3), 187-196.
- Setyorini dan Yusnawan. (2016). Kandungan Metabolit Sekunder pada Aneka Kacang. *Iptek Tanaman Pangan*, 11(2).
- Winarsi, Hery. (2013). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Kanisius, Yogyakarta.
- Rizkayanti, Anang Wahid. M. Diah, & Minarni Rama Jura. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera Lam.*). *Jurnal Akademika Kimia*, 6(2), 125-131.