

**Aktivitas Antioksidan Fraksi Polar Ekstrak Metanol dari Kulit Kayu Batang  
*Shorea acuminatissima* dengan Metode DPPH  
(Antioxidant Activity of Polar Fraction of Methanol Extract from Tree Bark Of  
*Shorea acuminatissima* with DPPH Method)**

Haryoto, Broto Santoso dan Hafid Nugroho  
Staf Pengajar Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

**ABSTRACT**

*Shorea acuminatissima*, which is known locally as Meranti kuning, is one species of Dipterocarpaceae family. This plant contains compounds that are expected to have antioxidant activity. This research was carried out to examine the radical scavenger activity of polar fraction of methanolic extract from the tree bark of *S. acuminatissima* by using DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) method with vitamin C as comparator. Powder of tree bark of *S. acuminatissima* was macerated in methanol. The methanolic extract was then evaporated to obtained dry extract. Extract with concentration of 200, 100, 50, 25 and 10 µg/mL were used to test its radical scavenger activity. The result showed that polar fraction of methanolic extract and vitamin has IC<sub>50</sub> value of 319.83 and 3.72 µg/mL, respectively.

**Keywords:** *Shorea acuminatissima*, Dipterocarpaceae, polar fraction, antioxidant, DPPH

**PENDAHULUAN**

*Shorea acuminatissima* dikenal dengan nama meranti kuning dan termasuk sub genus *Shorea* (Ashton, 1983). Penelusuran pustaka mengenai ilmu kimia tumbuhan *Shorea* menunjukkan bahwa metabolit sekunder yang dikandung genus tumbuhan ini kaya akan kelompok senyawa oligomer resveratrol, selain itu juga mengandung senyawa fenolik lainnya seperti flavanoid dan turunan asam fenolat (Hakim, 2002; Syah, 2005) dan juga senyawa non fenolik yaitu terpenoid (Haryoto, 2006). Semua senyawa tersebut diduga mempunyai efek sebagai antioksidan.

Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung elektron tidak berpasangan yang bertindak sebagai akseptor elektron (Connor, 2002). Radikal bebas ini berbahaya karena sangat reaktif mencari pasangan elektronnya. Radikal bebas ini memerlukan elektron yang berasal dari pasangan elektron molekul sekitarnya. Radikal bebas yang terbentuk dalam tubuh akan menghasilkan radikal bebas baru melalui reaksi berantai yang akhirnya jumlahnya terus bertambah dan menyerang tubuh. (Kalt, 1999).

Radikal bebas berupa molekul yang bermuatan dan bekerja pada substansi yang berbeda untuk menjadi netral, proses ini dinamakan oksidasi. Contoh oksidasi yang umum pada kehidupan sehari-hari termasuk logam berkarat, buah dan minyak tengik. Beberapa contoh radikal bebas antara lain: anion superoksida, radikal hidroksil, nitrit oksida, hidrogen peroksida dan sebagainya.

Radikal bebas yang umumnya digunakan sebagai model dalam penelitian antioksidan atau peredam radikal bebas adalah: 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). Kebanyakan penyusun aktivitas antioksidan dibangun dari tanaman dan buah, dan bukan vitamin, tetapi zat kimia yang dinamakan phenol, poliphenol, flavonoid, resveratrol. Kesemuanya merupakan komponen dari tanaman yang menjaga dari radikal bebas (Hamama, 1991; Prior, 1998).

Dalam makalah ini akan dilaporkan aktivitas antioksidan dari fraksi polar ekstrak metanol kulit kayu batang *S. acuminatissima* menggunakan metode DPPH.

**METODE**

**Bahan dan Peralatan Penelitian**

Bahan yang digunakan adalah jaringan tumbuhan berupa kulit kayu batang *S. acuminatissima* yang dikumpulkan dari wilayah HPH PT Aya Yayang Indonesia Camp 63, Tanjung, Tabalong, Kalimantan Selatan pada bulan Juli 2004. Contoh tumbuhan telah diidentifikasi di Herbarium Bogoriense, Balai Penelitian dan Pengembangan Biologi, LIPI, Bogor, Indonesia, dan spesimen disimpan di Herbarium tersebut. Penyiapan bahan tumbuhan dilakukan dengan membersihkan kulit batang kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari. Kulit kayu batang yang telah kering selanjutnya dipotong-potong dan dibuat serbuk.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Vacuum rotary evaporator, lampu

ultraviolet, neraca analitik, spektrofotometer UV-VIS, corong buchner, Jarum totol, Chamber, dan alat-alat gelas yang lazim digunakan di Laboratorium Kimia Analisis.

### Bahan Kimia

Pelarut yang digunakan ada yang berkualitas teknis seperti n-heksan, etil asetat, aseton, dan metanol, dan ada yang berkualitas pro analis yaitu kloroform. Untuk pelarut kualitas teknis maka dilakukan destilasi sebelum digunakan. Berbagai teknik pemisahan dengan kromatografi antara lain : kromatografi cair vakum (KCV) dilakukan dengan menggunakan silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub>, kromatografi kolom gravitasi (KKG) dan kromatografi lapis tipis (KLT) pada pelat aluminium berlapis silika gel Merck Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> 0,25 mm. Larutan penampak noda yang digunakan adalah serum sulfat Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O 1,5% dalam asam sulfat 2N.

### Pelaksanaan Penelitian

#### Ekstraksi

Ekstraksi senyawa polar dari kulit kayu batang *S. acuminatissima* dilakukan dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol yang dilakukan pada suhu kamar. Sebanyak 3,0 Kg serbuk kulit batang dimaserasi dalam metanol 3 × 10 L @ 24 jam sehingga diperoleh ekstrak metanol. Ekstrak metanol yang diperoleh selanjutnya dikeringkan dengan evaporator kemudian hasilnya dipartisi dengan menggunakan pelarut dietil eter yang berfungsi untuk mengendapkan tanin. Tanin yang mengendap kemudian dipisahkan dari ekstrak dengan cara dekantasi dan diperoleh ekstrak metanol-dietil eter. Pemisahan lebih lanjut dilakukan terhadap senyawa-senyawa polar yang larut dalam fraksi aseton-dietil eter.

#### Fraksinasi

Fraksinasi dengan metode kromatografi vakum cair dilakukan terhadap ekstrak metanol-dietil eter yang sudah kering. KCV dilakukan dengan menggunakan fasa diam silika gel Merck 60 GF<sub>254</sub> dan fasa gerak eluen organik yang ditingkatkan kepolarannya secara gradien. Ekstrak yang akan digunakan untuk satu kali proses KCV adalah sebanyak 20 gram dan eluen yang digunakan dimulai dari n-heksan 100%, n-heksan-etil asetat 6:4, 7:3, 8:2, etil asetat 100%, dan etil asetat-metanol 2:8. Hasil fraksinasi sebanyak 2,5 gram ekstrak kering metanol-dietil eter selanjutnya dipisahkan

dengan kromatografi kolom gravitasi (KKG) menggunakan kolom  $\Phi$  3 cm.

### Penyiapan larutan induk untuk uji peredaman radikal bebas secara spektrofotometri

#### Pembuatan Larutan Stok DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil)

Menimbang 3,9 mg DPPH (Mr=394,32) dilarutkan dalam 10 mL metanol, kocok hingga homogen dan simpan dalam botol yang gelap.

1. Preparasi sampel dan standar (kontrol positif)
 

Sampel dibuat dalam 4 konsentrasi berbeda, namun agar pekerjaan yang dilakukan tidak sia-sia dan banyak pelarut yang terbuang, dibuat dahulu larutan induk baik untuk sampel maupun standar (kontrol positif) yaitu pada konsentrasi 1000 ppm.
2. Kontrol positif yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah vitamin C.
3. Pembuatan larutan induk standar (kontrol positif) dan sampel (1000 ppm) :
  - a. Standar : timbang 2,0 mg vitamin C, dilarutkan dalam 2 mL metanol, kocok hingga larut dan homogen.
  - b. Sampel : timbang 2,0 mg sampel dilarutkan dalam 2 mL metanol, kocok hingga larut dan homogen.
  - c. Blangko : blangko dibuat dengan cara memipet 1600  $\mu$ L metanol kedalam tabung reaksi, tambahkan sebanyak 400  $\mu$ L larutan DPPH, kocok hingga homogen kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.
  - d. Pembuatan larutan vitamin C 2  $\mu$ g/mL: sebanyak 4  $\mu$ L larutan induk vitamin C dipipet kedalam tabung reaksi, tambahkan metanol hingga volume 1600  $\mu$ L, kemudian tambahkan 400  $\mu$ L larutan DPPH, kocok hingga homogen dan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit.

### Metode Pengukuran Efek Peredaman Terhadap Radikal Bebas DPPH

#### Penyiapan larutan Pereaksi

Larutan pereaksi adalah larutan 3,9 mg DPPH (Mr=394,32) yang dilarutkan dalam 10 mL metanol, kocok hingga homogen dan disimpan dalam botol yang gelap.

### Penentuan panjang gelombang maksimum dan waktu reaksi

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dilakukan sebagai berikut: 3,0 mL larutan DPPH pada 2.4.3.1 ditambah 1,5 mL metanol dikocok hingga homogen dan diamati serapannya pada rentang  $\lambda$  700-400 nm. Waktu reaksi ditetapkan dengan mengamati spektrum larutan DPPH diatas pada rentang  $\lambda$  700-400 nm, dengan interval waktu pengamatan 5, 10, 15, 30, 45, dan 60 menit.

### Pengukuran absorbansi peredaman radikal bebas DPPH

Diambil 2 mL larutan uji berbagai konsentrasi (200, 100, 50 dan 10 ppm), ditambah 3,0 mL larutan pereaksi DPPH dalam tabung reaksi kering, dikocok homogen dan diamati absorbansinya pada  $\lambda$  maksimum pada waktu reaksi yang ditetapkan. Untuk blangko digunakan metanol (2 mL) ditambah 3,0 mL larutan pereaksi DPPH.

Presentase peredaman dihitung dengan rumus sebagai berikut (23) :

$$\text{Persen (\% Inhibition Concentration)} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

Dari harga % peredaman yang diperoleh, dihitung persamaan garis regresi linear untuk selanjutnya ditentukan harga konsentrasi hambat efektif 50%-nya ( $IC_{50}$ ).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian peredaman radikal bebas DPPH fraksi polar ekstrak metanol kulit kayu batang *S. acuminatissima* menunjukkan bahwa memberikan hasil pemucatan warna pereaksi DPPH, yaitu memberikan bercak kuning dengan latar belakang ungu pada plat KLT silika gel GF<sub>254</sub> yang telah disemprot dengan pereaksi DPPH. Hal ini berarti bahwa didalam fraksi polar ekstrak tersebut terdapat senyawa-senyawa yang mempunyai daya meredam radikal bebas (antioksidan) terhadap DPPH. Untuk mengetahui seberapa besar daya peredamnya dilakukan pengukuran secara spektrofotometri visibel.

Prinsip pengukuran secara spektrofotometri visibel adalah mengukur besarnya absorbansi pemucatan warna larutan DPPH. Dari berbagai konsentrasi larutan uji diukur % peredamannya menggunakan rumus (23). Nilai 0% berarti larutan uji tidak mempunyai daya peredaman radikal bebas, sebaliknya nilai 100% berarti peredaman total. Secara teoritis  $\lambda$  maksimum untuk larutan DPPH dalam metanol adalah 517 nm, tetapi hasil pengamatan dalam penelitian ini adalah 516 nm. Hal ini antara lain disebabkan oleh faktor perbedaan instrumen yang digunakan. Atas dasar tersebut, untuk selanjutnya pengukuran dilakukan pada  $\lambda$  maksimum 516 nm. Melalui pengamatan pada berbagai waktu reaksi, akhirnya ditetapkan waktu reaksi yang digunakan pada menit ke 30, dengan alasan pengamatan absorbansi pada

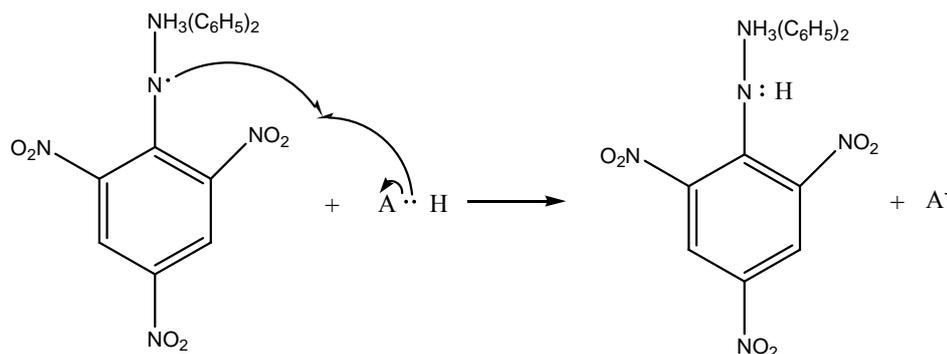
menit tersebut sudah cukup untuk memberikan kesempatan terjadinya reaksi, waktu lebih singkat (dibanding 60 menit), dan pada dasarnya pengukuran daya peredaman disini bersifat relatif, yaitu membandingkan reaksi yang terjadi pada kondisi pengukuran yang sama.

DPPH merupakan senyawa radikal bebas yang paling stabil dibandingkan dengan contoh-contoh radikal bebas yang lainnya, sehingga apabila digunakan sebagai pereaksi cukup dilarutkan dan tidak perlu dibuat *recenter paratus* dengan cara mereaksikan pereaksi-pereaksi sebagaimana yang dilakukan pada radikal bebas nitrit oksida. Senyawa ini jika disimpan dalam keadaan kering dan kondisi penyimpanan yang baik akan tetap stabil selama bertahun-tahun. Adapun reaksi antara DPPH dengan senyawa peredam radikal bebas digambarkan sebagai berikut pada Gambar 1.

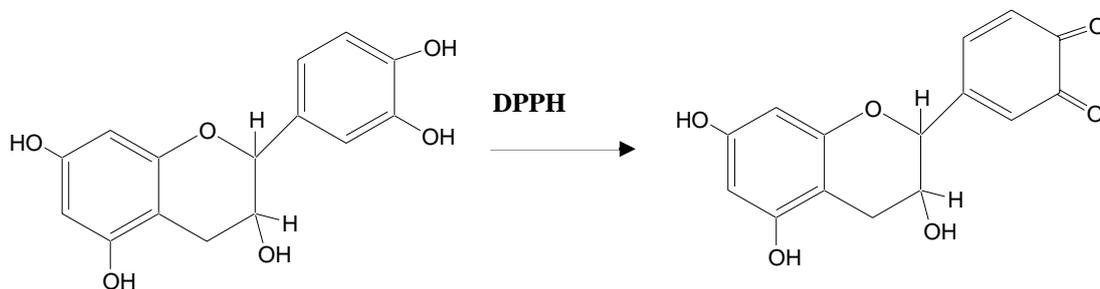
Atom H adalah suatu atom hidrogen yang mengandung satu proton dan satu elektron yang merupakan contoh paling sederhana dari radikal bebas, dan dalam hal ini berasal senyawa peredam radikal bebas yang berasal dari senyawa yang kita uji. Dengan terjadinya reaksi tersebut maka radikal bebas DPPH akan menjadi DPP Hidrazin yang stabil yang apabila secara kasat mata akan menunjukkan warna kuning yang bisa ditunjukkan oleh pemucatan warna kuning pada kertas KLT silika Gel GF<sub>254</sub> yang telah disemprot larutan DPPH. Sebaliknya peredam radikal bebas yang kehilangan H akan menjadi radikal baru yang reaktif. Banyak senyawa yang mampu meredam radikal bebas, tetapi suatu senyawa dapat digunakan sebagai peredam radikal bebas

yang bermanfaat apabila setelah bereaksi dengan radikal bebas akan menghasilkan radikal baru yang stabil atau senyawa bukan radikal. Pada radikal bebas, stabilitasnya dapat disebabkan oleh pengaruh resonansi, halangan ruang maupun oleh besarnya molekul. Contoh

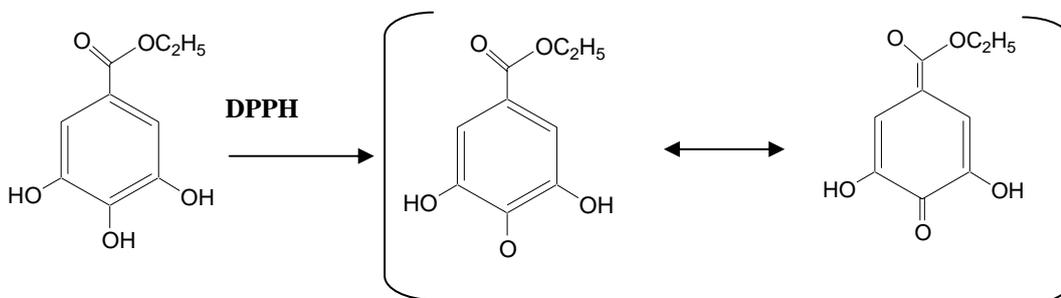
reaksi antara radikal bebas (DPPH) dengan senyawa peredam radikal bebas membentuk senyawa bukan radikal, dan radikal bebas yang distabilkan resonansi, masing-masing dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 1 : Reaksi antara DPPH dengan ion  $\text{H}^+$  yang berasal dari senyawa peredam radikal bebas



Gambar 2 : Reaksi antara (+)-katecin dengan DPPH

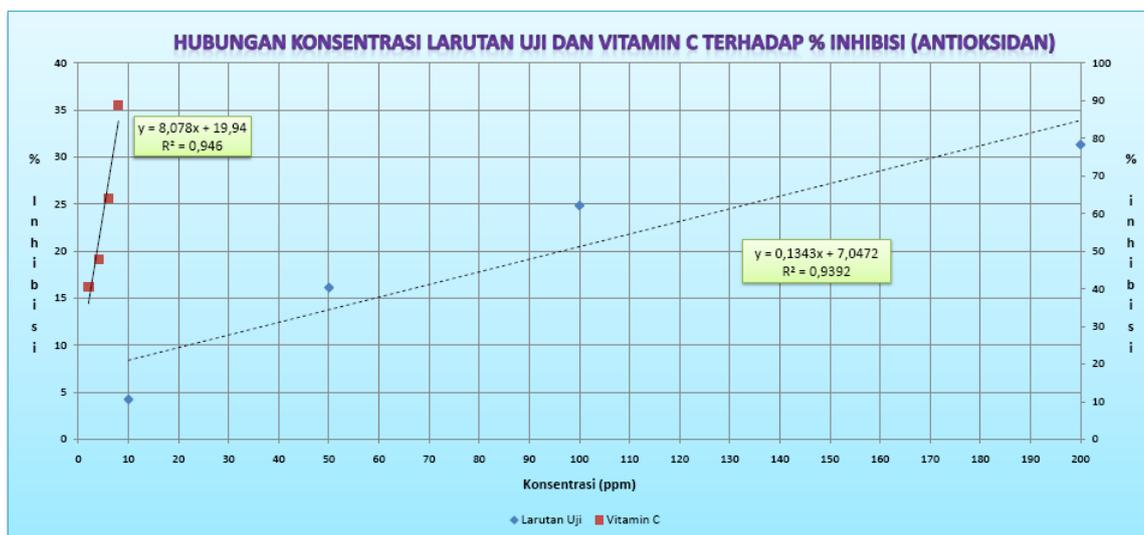


Gambar 3 : Reaksi antara etil galat dengan DPPH

Setelah mendapatkan harga % peredaman, selanjutnya dihitung besar koefisien korelasi r, antara kadar larutan uji terhadap % peredaman dengan menggunakan rumus (23). Berdasarkan perhitungan terdapat korelasi positif kuat antara konsentrasi semua larutan uji dengan % peredaman, artinya semakin tinggi kadar larutan uji, maka semakin tinggi pula daya peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Grafik hubungan antara konsentrasi larutan uji dan vitamin C dengan % hambatan/ peredaman dapat dilihat pada Gambar 4.

Selanjutnya dihitung persamaan garis regresinya, berdasarkan rumus  $Y = BX + A$ . Dari persamaan garis tersebut dihitung harga  $IC_{50}$ -nya yang merupakan konsentrasi larutan

uji yang mampu meredam 50% larutan radikal bebas DPPH. Harga  $IC_{50}$  menggambarkan besarnya daya meredam radikal bebas (antioksidan) larutan uji dan sebagai pembanding adalah vitamin C, disebabkan senyawa ini memiliki daya meredam radikal bebas (antioksidan) yang baik. Oleh karena itu vitamin C dapat digunakan untuk membandingkan daya meredam radikal diantara senyawa-senyawa peredam radikal bebas. Data % inhibisi, persamaan regresi linear dan harga  $IC_{50}$  dari vitamin C dapat dilihat pada Tabel 1. Sedangkan untuk persamaan regresi serta harga  $IC_{50}$  untuk larutan uji dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 4. Hubungan konsentrasi larutan uji dan vitamin C terhadap % hambatan

Tabel 1. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi vitamin C dengan % inhibisi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% inhibisi
8	0,1233	88,86
6	0,3969	64,15
4	0,5770	47,88
2	0,6594	40,43

- A = 19,94;
- B = 8,078;
- r = 0,946;
- y = 8,078x + 19,94
- $IC_{50}$  = 3,72  $\mu$ g/mL
- X = konsentrasi vitamin C
- Y = aktivitas penangkap radikal rata-rata vitamin C

Persamaan Regresi Linier :  $Y = BX + A$

Tabel 2. Hubungan antara konsentrasi dan absorbansi larutan uji dengan % inhibisi

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% inhibisi
200	2,438	31,337
100	1,832	24,856
50	2,045	16,119
10	2,435	4,225

Persamaan Regresi Linier :

- A = 7,0472;
- B = 0,1343;
- R = 0,9392
- Y = 0,1343x + 7,0472
- IC<sub>50</sub> = 319,83 µg/mL
- x = konsentrasi fraksi polar ekstrak metanol
- y = aktivitas penangkap radikal rata-rata fraksi polar ekstrak metanol

### KESIMPULAN

Pada penelitian ini telah berhasil mengungkapkan bahwa fraksi polar ekstrak metanol kulit kayu batang *S. acuminatissima* mempunyai efek sebagai antioksidan. Sifat antioksidan dari fraksi polar ekstrak metanol kulit kayu batang tumbuhan ini kurang aktif dibanding vitamin C sebagai kontrol positif mempunyai nilai IC<sub>50</sub> berturut-turut 319,83 dan 3,72 µg/mL.

### Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Kepala Pusat Penelitian Kimia LIPI Serpong Bapak Dr. L. Broto Sugeng Kardono, APU dan Staf peneliti LIPI Ibu Ir. Nina Artanti, M.Sc. atas bantuannya dalam perijinan dan bimbingannya melakukan uji antioksidan. Terima kasih disampaikan pula kepada Staff Herbarium Bogoriense, Bogor, yang telah membantu mengidentifikasi spesimen tumbuhan. Ibu Kholifatul Rosyidah, M.Si, Staff pengajar Universitas Lambung Mangkurat, Kalimantan Selatan, yang telah membantu mengumpulkan jaringan tumbuhan pada penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

Arts M. J. T. J., Haenen, G. R. M. M., Voss, H.-P., & Bast, A., 2004. Antioxidant capacity of reaction products limits the

applicability of the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology*, **42** : 45–49.

- Connor A. M., Luby, J. J., Hancock, J. F., Berkheimer, S., & Hanson, E. J., 2002. Changes in fruit antioxidant activity among blueberry cultivars during cold-temperature storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50** : 893–898.
- Hamama A. A., & Nawar, W., 1991. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **39** : 1063–1069.
- Hakim E.H., Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Lia D. Juliawaty, Lukman Makmur, 2002. Oligostilbenoid dari tumbuh-tumbuhan Indonesia. *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, **2** : 1-19.
- Haryoto S., Euis H.Hakim, Yana M. Syah, Sjamsul A. Achmad, Lia D. Juliawaty dan Jalifah Latip, 2006. Trimerstilbenoid dari Kulit Batang *Shorea Rugosa*. *Bull. Soc. Nat. Prod. Chem. (Indonesia)*, **6** : 7-11.
- Inoue M., Suzuki, R., Koide, T., Sakaguchi, N., Ogihara, Y., Yabu, Y., 1994. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60 RG cells. *Biochem. Biophys. Commun.* **204** : 898–904.
- Kanner J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, J. E., 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42** : 64–69.
- Kalt W., Forney, C. F., Martin, A., & Prior, R. L., 1999. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** : 4638–4644.
- Larrauri J. A., Ruperez, P., & Calixto, F. S., 1996. Antioxidant activity of wine pomace. *American Journal of Enology and Viticulture*, **47** : 369–372.
- Larrauri J. A., Ruperez, P., & Saura-Calixto, F., 1997. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45** : 1390–1393.

- Larrauri J. A., Sanchez-Moreno, C., Ruperez, P., & Saura-Calixto, F., 1999. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47** : 1603–1606.
- Okuda T., 1999. *Antioxidants in herbs: Polyphenols*. In: Packer, L., Hiramatsu, M., Yoshikawa, T. (Eds.), *Antioxidant food supplements in human health*. Academic Press, San Diego : 393–410.
- Prior R. L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., McEwen, J., O'Brien, C., 1998. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46** : 2686–2693.
- Saha P.K., Ganguly, S.N., 1999. *Fitoterapia*, **50** : 7-9.
- Yana M. Syah, Merry D. Surya, Emilio L. Ghisalberti, Euis H. Hakim, Lia D. Juliawaty, Sjamsul A. Achmad., 2005. Trimer dan Tetramer Resveratrol dari Kayu Akar *Shorea Javanica*. **5** : 13-22.
- Zheng Z., Zhao, S., Deng, J., Zhao, H., Ye, W., Wang, M., 1994. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, **25** : 262-264.