

Daya antioksidan ekstrak etanol Daun Kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara *in vitro*

Antioxidant potency of ethanolic extract of Kemuning leaves (*Murraya paniculata* (L) Jack) *in vitro*

Abdul Rohman dan Sugeng Riyanto

Laboratorium Kimia Analisis, Bagian Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada

Abstrak

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi radikal bebas dalam tubuh. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) dengan menggunakan metode linoleat-tiosianat dan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil). Ekstrak etanol diencerkan dalam berbagai konsentrasi yakni 1 %, 5 % dan 10 %, kemudian diuji daya anti-oksidannya.

Dengan metode linoleat-tiosianat, hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kemuning dengan konsentrasi 1%; 5% dan 10 % mempunyai daya antioksidan dengan perbedaan absorbansi yang signifikan ($P < 0,05$).

Ekstrak etanol daun kemuning dengan konsentrasi yang berbeda juga diuji daya antioksidannya dengan metode DPPH dan hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kemuning mempunyai nilai IC_{50} sebesar 126,17 $\mu\text{g/ml}$, 15 kali lebih lemah dibanding dengan vitamin E (IC_{50} vitamin E = 8,27 $\mu\text{g/ml}$). Daya antioksidan daun kemuning kemungkinan ditimbulkan oleh karena adanya kandungan flavonoidnya.

Kata kunci : antioksidan, ekstrak etanol, daun kemuning

Abstract

Antioxidants are the compounds capable to inhibit free radical reactions in the human body. This research was aimed to identify the antioxidant potency of ethanolic extract of kemuning leaves *in vitro* by using linoleic-thiocyanate and DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl) methods. The ethanolic extract of kemuning leaves was diluted in various concentrations i.e. 1%,5% and 10% and determined their antioxidant potencies.

By using linoleic-thiocyanate method, the result suggested, that ethanolic extract of 1%; 5 % and 10 % showed antioxidant potencies and had significant different absorbances ($P < 0,05$).

The antioxidant potencies of ethanolic extract with different concentrations were also measured by DPPH method and the result showed that ethanolic extracts of kemuning leaves revealed the antioxidant activity with the IC_{50} of 126,17 $\mu\text{g/ml}$, 15 times lower than that of vitamin E (IC_{50} of 8,27 $\mu\text{g/ml}$). The antioxidant activity of kemuning leaves probably due to the flavonoid content.

Key words : Antioxidant, ethanolic extract, kemuning leaves

Pendahuluan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat spesies oksigen reaktif/spesies nitrogen reaktif (ROS/RNS) dan juga radikal bebas sehingga antioksidan dapat mencegah penyakit-penyakit yang dihubungkan dengan radikal bebas seperti karsinogenesis, kardiovaskuler dan penuaan (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Antioksidan sintetik seperti BHA, (butil hidroksi anisol), BHT (butil hidroksi toluen), PG (propil galat), dan TBHQ (*tert*-butil Hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Amarowicz *et al.*, 2000) sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan.

Beberapa studi epidemiologi menunjukkan bahwa peningkatan konsumsi antioksidan fenolik alami yang terdapat dalam buah, sayur mayur, dan tanaman serta produk-produknya mempunyai manfaat besar terhadap kesehatan yakni dapat mengurangi resiko terjadinya penyakit jantung koroner (Ghiselli *et al.*, 1998). Hal ini disebabkan karena adanya kandungan beberapa vitamin (A,C,E dan folat), serat, dan kandungan kimia lain seperti polifenol yang mampu menangkap radikal bebas (Gill *et al.*, 2002).

Kemuning (*Murraya paniculata* (L.) Jack) termasuk dalam familia rutaceae (Backer dan Van den Brink, 1968). Daun kemuning secara tradisional digunakan untuk orkitis, bronchitis, infeksi saluran kencing, kencing nanah, keputihan, serta pelangsing tubuh (Dalimartha, 1999). Tanaman ini juga dapat digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol darah dengan kandungan utama flavonoid dan tanin (Anonim, 2001).

Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (*radical scavenging*) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorny *et al.*, 2001).

Secara *in vitro*, flavonoid merupakan inhibitor yang kuat terhadap peroksidasi lipid, sebagai penangkap spesies oksigen atau nitrogen yang reaktif, dan juga mampu menghambat aktivitas enzim lipooksigenase dan

siklooksigenase (Halliwell and Gutteridge, 2000).

Da Silva *et al.* (1980) telah melaporkan kandungan utama ekstrak metanol daun kemuning yaitu: 4'-hidroksi-3,5,6,7,3',5'-heksametoksi flavon. Berdasarkan adanya kandungan flavonoid ini, maka dilakukan penelitian daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning.

Metodologi

Bahan

Bahan yang digunakan adalah: daun kemuning, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dari Sigma. Etanol, asam klorida, bufer fosfat pH 7, fero klorida, vitamin E, asam linoleat, amonium tiosianat diperoleh dari E.Merck.

Alat

Spektrofotometer UV-Vis model Genesys-5, *vacuum rotary evaporator*, neraca elektrik, incubator.

Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol daun kemuning.

Sebanyak 2,5 kg daun kemuning ditambah 5 L etanol dan dicampur homogen sambil sesekali diaduk. Campuran didiamkan selama 4 hari dan selanjutnya filtrat diambil melalui penyaringan dan diendapkan selama satu hari. Setelah diendapkan, pelarut diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak etanol. Ekstrak etanol ini selanjutnya digunakan untuk membuat seri konsentrasi sebesar 1%, 5 % dan 10 % untuk diuji daya antioksidannya.

2. Uji daya antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat.

Daya antioksidan ekstrak etanol kemuning ditentukan dengan metode linoleat-tiosianat (Osawa dan Namiki, 1981). Sebanyak 200 µL ekstrak etanol dengan berbagai konsentrasi (1%, 5 % dan 10 %) ditambah 130 µL asam linoleat, 10 mL etanol, dan 10 mL buffer fosfat pH 7 kemudian ditambah akuades sampai volume 25,0 mL. Larutan ini kemudian diinkubasi dalam *conical flask* pada suhu 40 °C dan setiap 12 jam sekali diukur kandungan peroksidanya dengan cara: Diambil 200 µL larutan diatas, lalu ditambah 9,4 mL etanol; 200 µL larutan amonium tiosianat 30 %; dan 200 µL fero klorida (20 mM dalam 3,5 % HCl), lalu divortek selama 3 menit dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi kontrol seperti semua proses diatas tapi tanpa penambahan ekstrak etanol daun kemuning. Hasil daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning

dibandingkan dengan pembanding vitamin E 1% yang sudah diketahui sebagai antioksidan.

3. Uji daya antioksidan dengan metode DPPH

Sebanyak 100 µL ekstrak (dengan berbagai konsentrasi), ditambah 1,0 mL DPPH 0,4 mM dan etanol sampai 5,0 mL. Campuran selanjutnya divorteks dan dibiarkan selama 30 menit. Larutan ini selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Dilakukan juga pengukuran absorbansi blanko. Hasil penetapan antioksidan dibandingkan dengan vitamin E.

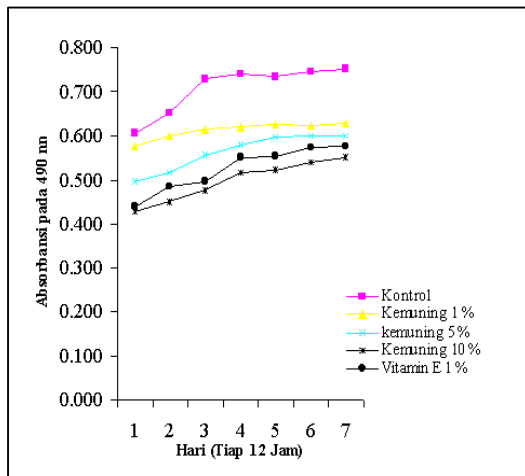
Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus:

$$\text{daya antioksidan} = \frac{(\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs blanko}} \times 100 \%$$

Hasil Dan Pembahasan

1. Daya antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat

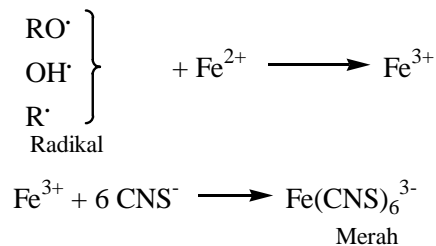
Hasil pengukuran daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning 1%, 5% dan 10% dengan menggunakan metode sistem linoleat-tiosianat selama 7 hari yang ditandai dengan menurunnya absorbansi ketiga konsentrasi ekstrak tersebut serta menggunakan pembanding vitamin E (α-tokoferol) 1% (Gambar 1).



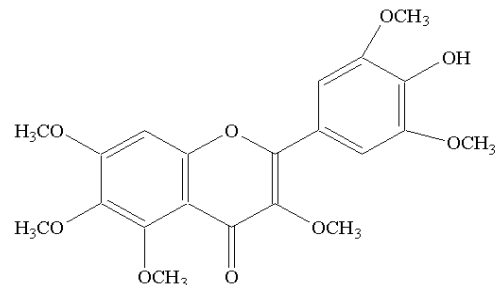
Gambar 1. Grafik hubungan antara ekstrak etanol daun kemuning 1%, 5% dan 10%, vitamin E 1% serta kontrol dengan absorbansinya selama 7 hari

Ekstrak etanol daun kemuning mempunyai daya antioksidan yang ditandai dengan menurunnya absorbansi ekstrak etanol daun kemuning dibanding dengan kontrol, dengan urutan daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning 10% > vitamin E 1% > ekstrak etanol daun kemuning 5% > ekstrak etanol daun kemuning 1%. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol dapat meningkatkan daya antioksidannya secara signifikan (P<0,05).

Dalam metode linoleat-tiosianat ini sebagai sumber radikal adalah asam linoleat yang merupakan asam lemak tidak jenuh. Radikal merupakan senyawa oksidator. Radikal ini akan mengoksidasi ion ferro (dari feroklorida) menjadi ion feri yang dengan adanya ion tiosianat akan menghasilkan kompleks feri-tiosianat yang berwarna merah dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



Flavonoid dapat bertindak sebagai antioksidan dengan cara menangkap radikal (Pokorny, *et al*, 2001). Da Silva *et al*. (1980) telah melaporkan kandungan ekstrak metanol daun kemuning yaitu: 4'-hidroksi-3,5,6,7,3',5'-heksametoksi flavon (Gambar 2) sehingga senyawa inilah yang kemungkinan berperan sebagai



Gambar 2. Struktur 4'-hidroksi-3,5,6,7,3',5'-heksametoksi flavon yang ada di kemuning

Tabel I. Hubungan antara kadar ekstrak etanol daun kemuning dengan daya antioksidan dengan metode DPPH

Kadar ekstrak etanol (µg/ml)	Absorbansi sampel*	Aktivitas antioksidan (%)*	Persamaan garis regresi linier
50	0,718	19,98	$y = 0,376 x + 2,515$ $r = 0,9975$ $IC_{50} = 126,17 \mu\text{g/ml}$
100	0,525	41,40	
150	0,353	60,60	
200	0,214	76,12	

*Hasil tersebut merupakan hasil dari 3 kali pengukuran

*Absorbansi kontrol 0,896

Tabel II. Hubungan antara kadar vitamin E dengan daya antioksidan dengan metode DPPH

Kadar vitamin E (µg/ml)	Absorbansi Sampel*	Daya antioksidan (%)	Persamaan garis regresi linier
2,5	0,792	12,43	$y = 6,588 x - 4,46$ $r = 0,9995$ $IC_{50} = 8,27 \mu\text{g/ml}$
5,0	0,648	28,28	
7,5	0,505	44,10	
10	0,343	62,06	
20	0,116	87,17	

*Hasil tersebut merupakan hasil dari 3 kali pengukuran

*Absorbansi kontrol 0,904

antioksidan pada ekstrak etanol daun kemuning, mengingat antara metanol dan etanol perbedaan polaritasnya kecil sehingga senyawa ini kemungkinan besar terdapat juga pada ekstrak etanol daun kemuning. Dari struktur kimia 4'-hidroksi-3,5,6,7,3',5'-heksa-metoksi flavon dapat diinformasikan bahwa senyawa ini mengandung OH fenolik sehingga dapat beraksi sebagai penangkap radikal.

2. Daya antioksidan dengan metode DPPH

Uji daya antioksidan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) dimaksudkan untuk menguatkan aktivitas suatu senyawa uji (ekstrak etanol daun kemuning) sebagai antioksidan karena sebagaimana diketahui daya antioksidan dapat dilakukan dengan berbagai macam metode.

Meskipun suatu senyawa uji menunjukkan daya antioksidan yang tinggi dengan salah satu metode, tidak selalu akan memberikan hasil yang sama baiknya dengan menggunakan metode lainnya sehingga disarankan untuk mengukur daya antioksidan dengan berbagai macam metode (Takaya, *et al.*, 2003).

DPPH merupakan radikal sintetik yang larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol. DPPH merupakan radikal yang stabil yang dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 515 nm.

Hasil pengukuran daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning dengan menggunakan metode DPPH (Tabel I).

Sebagai pembanding digunakan vitamin E yang sudah diketahui sebagai antioksidan. Hasil pengukuran daya antioksidan vitamin E dengan metode DPPH (Tabel II).

Hasil (Tabel II) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kemuning mempunyai daya antioksidan dengan metode DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 126,17 µg/ml. IC_{50} merupakan konsentrasi kemuning yang mampu memberikan persen penangkapan radikal sebanyak 50 % dibanding kontrol melalui suatu persamaan garis regresi linier, semakin kecil nilai IC_{50} berarti semakin kuat daya antioksidannya. Nilai IC_{50} ini jauh lebih besar daripada nilai IC_{50} vitamin E yakni sebesar 8,27 µg/ml. Hal ini menunjukkan bahwa daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning 15

kali lebih kecil dibanding dengan daya antioksidan vitamin E dengan menggunakan metode DPPH.

Kesimpulan

1. Ekstrak etanol daun kemuning menunjukkan daya antioksidan dengan metode linoleat-tiosianat dan DPPH secara *in vitro*.
2. Dengan metode linoleat-tiosianat, ekstrak etanol daun kemuning mempunyai daya antioksidan yang ditandai dengan menurunnya absorbansi ekstrak 1%, 5% dan 10 % dibanding kontrol secara signifikan,

sedangkan dengan metode DPPH, ekstrak etanol daun kemuning memberikan nilai IC_{50} sebesar 126,17 $\mu\text{g/ml}$ jauh lebih besar dibanding dengan nilai IC_{50} vitamin E yakni sebesar 8,27 $\mu\text{g/ml}$.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Fakultas Farmasi UGM yang membiayai penelitian ini melalui dana Daftar Isian Kegiatan Suplemen (DIKS) Fakultas Farmasi UGM tahun 2004.

Daftar Pustaka

- Amarowicz, R., Naczki, M., and Shahidi, F., 2000, Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed Hulls, *JAOCS*, 77, 957-961.
- Anonim, 2001, *Obesity and Chronic health Problems*, www.ahelthyme.com/article/belhowell/101355993.
- Backer, C.A., and Van der Brink, R.B.C, 1968, *Flora of java*, N.V.D. Noordhoff, Groningen.
- Dalimartha, S., 1999, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, jilid I, Trubus agriwidya, Ungaran.
- Da Silva, L.B., Da Silva, U.L.L., Mahendran, M and Jennings, R.C., 1980, 4'-Hydroxy-3,5,6,7,3',5'-hexamethoxy flavone, *Phytochemistry*, 19, 2794.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., and Scaccini, C., 1998, Antioxidant Activity of Different Phenolics Fractions Separated from an Italian Red Wine, *J. Agric. Food Chem*, 46, 361-367.
- Gill, M.I., Tomas, F.A.B., Pierce, B.H., and Kader, A.A., 2002, Antioxidant Capacities, Phenolic Compounds, Carotenoids, and Vitamin C Contents of Nectarine, Peach, and Plum Cultivars from California, *J. Agric. Food Chem*, 50, 4976-4982.
- Halliwell, B and Gutteridge, J.M.C., 2000, *Free Radical in Biology and Medicine*, Oxford University Press, New York.
- Osawa, T., and Namiki, M., 1981, A Novel Type of Antioxidant Isolated from Leaf Wax of Eucalyptus Leaves, *J. Agric. Biol. Chem*, 45, 735-739.
- Pokorni, J., Yanishlieva, N., and Gordon, M., 2001, *Antioxidant in Food; Practical Applications*, CRC Press, New York.
- Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T and Niwa, M., 2003, Antioxidant Constituents of Radish Sprout (Kaiware-daikon), *Raphanus sativus* L., *J. Agric. Food Chem*, 51, 8061-8066.