

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETER HASIL HIDROLISIS
INFUSA DAUN BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis)
DENGAN METODE DPPH (1,1-DIPHENIL-2-PICRYLHYDRAZYL)**

**ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ETHER FRACTION OF HIDROLYSED
INFUSE BINAHONG FOLIUM (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) WITH
DPPH (1,1-DIPHENIL-2-PICRYLHYDRAZYL) METHOD**

Agustina Ardianti, Any Guntarti, Zainab

*Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
Jl. Prof. Dr. Soepomo SH, Yogyakarta, Telp. (0274) 379418
Email: any_guntarti@yahoo.co.id.*

ABSTRAK

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi. Daun binahong mengandung flavonoid yang dapat mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong dan mengetahui harga EC_{50} nya. Fraksi eter diperoleh dengan menghidrolisis infusa daun Binahong menggunakan larutan HCl 2N, selanjutnya difraksinasi dengan pelarut eter. Pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer. Panjang gelombang serapan maksimum 515,0 nm (quersetin) dan 514,0 nm (fraksi eter). Waktu operasinya 19 – 30 menit (quersetin) dan 19 – 29 menit (fraksi eter). Uji aktivitas penangkapan radikal bebas dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Berkurangnya radikal DPPH dalam larutan menurunkan intensitas absorbansi dari sampel. Dari data persen penangkapan radikal bebas dapat dicari nilai EC_{50} (*Effective Concentration*). Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua sampel uji mempunyai aktivitas penangkapan radikal bebas. Hasil uji menunjukkan bahwa nilai EC_{50} quersetin ($2,702 \pm 0,15$) $\mu\text{g/ml}$, EC_{50} fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong ($249,31 \pm 9,26$) $\mu\text{g/ml}$. Analisis menggunakan uji statistik Kruskal Wallis (taraf kepercayaan 95%) dilanjutkan uji Mann Whitney menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara sampel dan kontrol (quersetin).

Kata kunci: Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), antioksidan, radikal bebas, DPPH.

ABSTRACT

Antioxidant is compounds which have abilities to inhibit oxidation rate. *Anredera cordifolia* folium consist of flavonoid which have activities as antioxidant. The purpose of this research was to know antioxidant activity at ether fraction of hydrolysed aqueous extract of Binahong folium (*Anredera cordifolia*). Ether fraction was obtained by hydrolysing the infuse Binahong folium (*Anredera cordifolia*) with HCl 2N then fractionated with ether and then evaporated. The antioxidant activity was measured by DPPH method using spectrophotometer. The maximum wavelength and operating time quercetin and samples were 515,0 nm (quersetin) and 514,0 nm (ether fraction), 19-30 minute (quersetin) and 19-29 minute (ether fraction). Scavenging activity test done with the DPPH method (1,1- dyphenyl-2-picrylhydrazyl). The decreasing of DPPH radical solution decreased the absorbant intensity. The percentage of radical scavenging activity was performed as EC_{50} (*Effective Concentration*). The results indicated that both samples showed free radical scavenging activity with EC_{50} value for quercetin ($2,702 \pm 0,15$) $\mu\text{g/ml}$, and ether fraction of ($249,31 \pm 9,26$) $\mu\text{g/ml}$. Statistical analysis using Kruskal Wallis method with 95% of confident level followed by Mann Whitney test

giving evidence the results between samples and positive control (quercetin) are significantly difference.

Keywords: Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis), antioxidant, free radical, DPPH.

PENDAHULUAN

Radikal bebas berperan dalam terjadinya suatu penyakit, karena radikal bebas mempunyai suatu elektron yang tidak berpasangan di permukaan kulit luarnya sehingga dia berusaha mencari elektron dari jaringan-jaringan yang ada di dalam tubuh yang disusun oleh sel-sel. Dalam tubuh terdapat senyawa yang disebut antioksidan yang dapat berperan aktif dalam menanggulangi masalah kelebihan radikal bebas. Namun, hal ini tergantung terhadap pola hidup dan pola makan yang benar (Kumalaningsih, 2006).

Antisipasi terhadap terbentuknya radikal bebas dalam tubuh dapat dilakukan dengan mengubah dan mengatur pola makan yang benar atau mengkonsumsi makanan tambahan (*supplement*) yang dapat diperoleh di sekitar kita. Aneka buah dan sayuran dapat dimanfaatkan sebagai sumber bahan antioksidan untuk meredakan radikal bebas (Hernani dan Rahardjo, 2005). Salah satu senyawa alam yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan adalah flavonoid (Sunarni *et al*, 2007).

Tanaman Binahong (*Anredera cordifolia*, (Ten.) Steenis) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang tersebar luas dan cukup terkenal di masyarakat Indonesia. Daun Binahong mengandung saponin, triterpenoid, minyak atsiri (Rachmawati, 2008) dan flavonoid quersetin (Yang *et al*, 2008). Adanya flavonoid kemungkinan besar daun Binahong dapat berkhasiat sebagai antioksidan (menangkap radikal bebas). Ditemukan adanya protein dengan BM besar pada Binahong (23kDa) yang diberi nama *ancordin* (Chuang *et al*, 2007). Pada hidrolisis asam ekstrak etanolik menghasilkan *asam oleanolik* (Moura-Lettset *al*, 2006).

Antioksidan merupakan senyawa yang mampu menghambat laju oksidasi. Antioksidan ini memiliki banyak komponen dan merupakan zat alami yang dihasilkan sendiri oleh tubuh atau didapat dari makanan yang kita makan. Antioksidan bekerja dengan cara menghentikan

pembentukan radikal bebas, menetralkan serta memperbaiki kerusakan-kerusakan yang terjadi (Dalimartha dan Soediby, 1999). Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas dianggap pasangan elektronnya. Radikal bebas dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh dengan cara mengikat elektron dari molekul sel tersebut dan dapat menyebabkan reaksi berantai yang merusak tubuh (Hanasakti *et.al.*, 1994).

Flavonoid adalah senyawa yang mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya. Flavonoid tersusun dalam konfigurasi C₆-C₃-C₆ yaitu dua cincin benzena yang dihubungkan oleh tiga atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga cincin itu masing-masing A,B, dan C.

Quersetin adalah salah satu zat aktif kelas flavonoid yang dijumpai pada tumbuhan dalam kadar tinggi. Quersetin (3',4'-dihidroksiflavonol) merupakan senyawa flavonoid dari kelompok flavonol. Senyawa flavon ini terdapat dalam banyak sayuran dan buah – buahan.

Dalam penelitian ini dilakukan uji kuantitatif dengan metode DPPH (1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil). DPPH adalah salah satu metode yang telah dikembangkan dalam aktivitas antioksidan. DPPH memiliki aktivitas penangkap radikal bebas yang tinggi dalam pelarut organik polar, seperti metanol atau etanol pada suhu kamar. Dalam uji DPPH, penangkapan radikal DPPH disertai dengan penurunan serapan pada panjang gelombang 515-517 nm (Suryanto *et al*, 2003).

METODE PENELITIAN

Alat

Timbangan analitik, *glassware*, blender, kompor, panci infusa, penangas air, termometer, kertas saring, kain flanel dan alat refluks, Spektrofotometer UV-Vis (Pharma Spec

Shimadzu UV – 1700), mikro pipet, pipa kapiler, bejana pengembang, lampu UV 366 nm.

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) yang diperoleh dari daerah Pacitan, Jawa Timur pada bulan April 2009. Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini berderajat pro analisis, yaitu aquadest, HCl, eter, Na₂SO₄ anhidrat, silika gel F 254, asam asetat glasial, butanol, uap ammonia, metanol absolut, asam fosfomolibdat, rutin, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman dan pembuatan simpisia

Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dilakukan berdasarkan buku Flora of Java (Van Steenis, 1997). Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta. Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) diambil yang telah tua yang warnanya hijau tua dan dikumpulkan, dicuci bersih pada air yang mengalir kemudian dikeringkan di bawah sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam. Setelah kering diblender sehingga diperoleh serbuk simpisia daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis).

2. Pembuatan infusa

Daun Binahong sebanyak 50 gram dalam panci infusa ditambahkan aquades sampai 600 ml. Campuran dipanaskan di atas penangas air selama 15 menit dihitung dari suhu 90°C sambil sesekali diaduk. Campuran diserkai selagi panas, disaring melalui kain flanel dan disaring dengan kertas saring kemudian dipekatkan.

3. Fraksinasi

Larutan induk infusa yang diperoleh dihidrolisis dengan asam klorida 2N sebanyak 100 ml, direfluks 1 jam, setelah pekatkan, dihidrolisis dan diekstraksi dengan eter sehingga

didapatkan senyawa dalam fraksi eter dan senyawa dalam air asam. Fraksi eter dikumpulkan, diuapkan digunakan sebagai sampel.

4. Uji pendahuluan adanya flavonoid

Fraksi eter ditotolkan pada silika gel F 254, kemudian dikembangkan dengan menggunakan fase gerak n-butanol:asam asetat glasial:air (4:1:5) v/v (fase atas).

5. Uji aktivitas penangkapan radikal bebas dengan metode DPPH

Uji aktivitas ini diawali dengan penentuan waktu operasi dan panjang gelombang serapan maksimum. Fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dan quersetin yang telah dilarutkan dengan metanol absolut dengan berbagai konsentrasi (1,0 ml), ditambah 1,0 ml larutan pereaksi DPPH dalam tabung reaksi kering, dikocok homogen dan diinkubasi selama *operating time*, kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dengan spektrofotometer UV-Vis. Untuk kontrol negatif digunakan metanol 1,0 ml ditambah 1,0 ml larutan pereaksi DPPH (Suryanto *et al*, 2003).

6. Analisis data

Dari data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Rumus perhitungan sebagai berikut:

$$\% \text{ Penangkapan} = \left[1 - \frac{(A_{\text{sampel pada } \lambda_{\text{maks}}})}{(A_{\text{kontrol negatif pada } \lambda_{\text{maks}}})} \right] \times 100\%$$

Dari % penangkap radikal dihitung persamaan garis regresi, untuk dicari menentukan harga konsentrasi efek 50%-nya (EC₅₀) (Suryanto *et al*, 2003). Data yang diperoleh dari hasil persen penangkapan radikal bebas dianalisis secara statistik dengan ANAVA satu jalan untuk parametrik dilanjutkan dengan uji Tukey dengan taraf kepercayaan 99%. Untuk non parametrik maka dilakukan analisis menggunakan uji Kruskal-Wallis dan uji Mann-Whitney.

HASIL DAN PEMBAHASAN

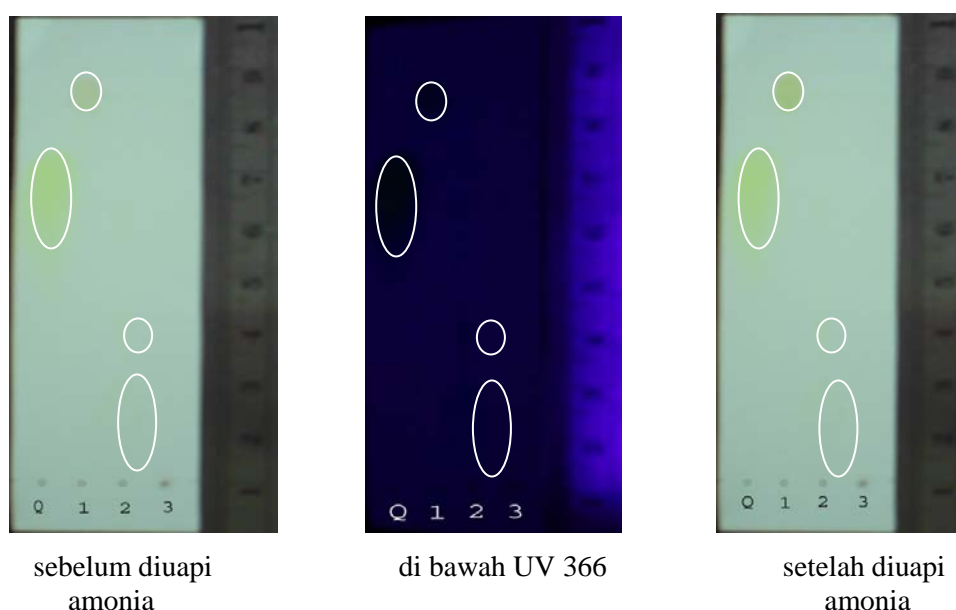
1. Penyarian dan Fraksinasi

Penyarian daun Binahong dilakukan dengan metode infundasi karena flavonoid yang terdapat dalam tanaman kebanyakan dalam bentuk glikosida flavonoid yang bersifat polar sehingga penyariannya dapat menggunakan air panas. Hidrolisis dengan menggunakan HCl 2N bertujuan untuk memecah ikatan antara gugus gula (glikon) dan gugus bukan gula (aglikon) pada glikosida. Hasil hidrolisis difraksinasi

dengan eter. Senyawa aglikon akan masuk dalam fase eter, yang lebih polar akan masuk ke fase asam.

2. Uji Pendahuluan Adanya Flavonoid

Uji pendahuluan dengan uap amonia dan Uji KLT dengan fase diam silika gel F 254; Fase gerak:BAW (n-butanol:asam asetat:air) (4:1:5 v/v, fase atas); deteksi : UV 366.



Gambar 1. Hasil kromatogram quersetin (1), fraksi eter hasil hidrolisis infusa (2), infusa (3) dan fraksi air asam (4)

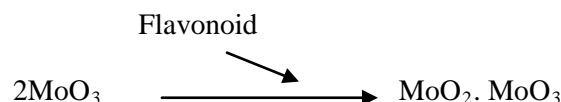
Tabel I. Data Rf kromatogram quersetin, fraksi eter hasil hidrolisis, infusa, dan fraksi air asam pada uji pendahuluan adanya flavonoid dengan Kromatografi Kertas menggunakan fase gerak BAW (4:1:5)

Totalan	Rf	Pengamatan mata		UV 366	
		Tanpa perlakuan	Diuapi ammonia	Tanpa perlakuan	Diuapi ammonia
Quersetin	0,69	Kuning	Kuning	Kuning	Kuning
Hasil hidrolisis	0,91	Coklat	Kuning	Coklat	Coklat
Infusa	0,20	Kuning pucat	Kuning pucat	Biru	Biru
	0,40	Kuning pucat	Kuning pucat	Biru	Biru
Air asam	-	-	-	-	-

Dari Tabel I diatas fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun binahong terdapat aglikon flavonoid. Pada infusa terdapat dua bercak sehingga terdapat 2 senyawa glikon yang berbeda polaritasnya. Penarikan air oleh natrium sulfat anhidrat optimal yang ditunjukkan dengan tidak adanya bercak pada fraksi air asam (fraksi tidak larut eter). Terjadinya warna kuning menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Timbulnya warna kuning tersebut disebabkan oleh adanya pembentukan struktur kuinoid pada cincin B yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih panjang (Robinson, 1991). Berdasarkan Yang *et al*, 2008 kandungan quersetin dalam daun binahong sekitar 0,6%.

3. Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan dengan Asam Fosfomolibdat

Uji kualitatif antioksidan dilakukan pada infusa, fraksi eter hasil hidrolisis infusa dan quersetin dengan asam fosfomolibdat. Terbentuknya warna biru menunjukkan adanya aktivitas antioksidan. Reaksi yang terjadi :



Gambar 2. Reaksi Uji Aktivitas antioksidan dengan Asam Fosfomolibdat

4. Uji Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas DPPH

Uji aktivitas penangkapan radikal bebas dengan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*). Mekanisme reaksi antara senyawa uji dan DPPH yaitu molekul radikal DPPH akan bereaksi dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh senyawa uji sehingga senyawa *1,1-difenil-2-pikrilhidrazil* menjadi berkurang intensitas warna ungunya atau menjadi berwarna kuning sampai jernih. Pengurangan intensitas warna ungu disebabkan oleh terbentuknya senyawa kompleks antara senyawa uji dengan DPPH. Aktivitas antioksidan quersetin sebagai penangkap radikal bebas DPPH dinyatakan dengan nilai persen penangkapan radikal bebas.

Tabel II. Persentase penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai EC₅₀ oleh quersetin pada berbagai konsentrasi

% Penangkapan radikal bebas					Persamaan regresi linear	EC ₅₀ (µg/ml)
1	2	3	4	5		
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml		
25,00	39,25	45,98	66,64	77,33	Y= 13,005X+11,425	2,966
25,91	44,04	52,85	72,93	69,43	Y= 11,593X+18,253	2,738
24,61	43,65	53,50	71,76	82,25	Y= 14,339X+12,137	2,641
26,42	42,88	48,58	70,59	73,32	Y= 12,151X+15,905	2,806
26,68	45,59	56,61	71,63	82,77	Y= 13,822X+15,190	2,518
22,67	43,91	58,55	72,66	82,51	Y= 14,843X+11,531	2,592
23,06	42,10	56,61	72,28	81,22	Y= 14,650X+11,104	2,655
Rerata						2,702
SD						0,15
CV						5,55%

Dari tabel nilai EC₅₀ nya dan diperoleh nilai rata – rata EC₅₀ quersetin adalah 2,702 µg/ml.

Tabel III. Persentase penangkapan radikal bebas DPPH dan nilai EC₅₀ oleh fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong pada berbagai konsentrasi pada berbagai konsentrasi

% Penangkapan radikal bebas						Persamaan regresi linear	EC ₅₀ µg/ml
50	75	100	125	150	200		
µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml		
10,37	16,83	21,22	26,22	29,15	40,24	Y= 0,1918X+1,627	252,21
13,05	17,20	24,15	26,95	30,36	41,95	Y= 0,1881X+3,664	246,34
14,27	15,85	21,46	24,27	30,85	40	Y= 0,1779X+3,694	260,29
12,44	18,54	22,32	25,61	28,17	45,24	Y= 0,2022X+1,798	238,39
Rerata							249,31
SD							9,26
CV							3,71

Dari Tabel II dan III dapat diketahui nilai EC_{50} quersetin lebih kecil dibandingkan dengan EC_{50} fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong. Hal ini menunjukkan bahwa quersetin mempunyai kemampuan menangkal radikal bebas lebih besar dari fraksi eter hasil hidrolisis daun Binahong. Potensi quersetin 88,94 kali lebih besar dibandingkan dengan sampel fraksi eter hasil hidrolisis daun Binahong.

Hasil uji distribusi normal tersebut didapatkan harga signifikansi sebesar 0,059. Harga yang diperoleh lebih besar dari 0,05 sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal. Uji homogenitas varian dengan Uji Levene diperoleh harga signifikansi 0,003 lebih kecil dari 0,05 disimpulkan tidak homogen. Karena tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji analisis statistik non parametrik menggunakan Uji Kruskal Wallis dengan taraf kepercayaan 95%. Data Uji Kruskal Wallis.

Dari Uji Kruskal Wallis di atas diperoleh harga signifikansi 0,008 yang lebih kecil dari 0,05 yang artinya bahwa pada berbagai kelompok perlakuan terdapat perbedaan yang bermakna. Kemudian dilanjutkan dengan Uji Mann – Whitney diperoleh harga signifikansi sebesar 0,006 yang lebih kecil dari 0,05 yang berarti terdapat perbedaan yang bermakna nilai EC_{50} antara quersetin dan sampel fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong.

KESIMPULAN

Quersetin dan fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) memiliki aktivitas antioksidan pada semua konsentrasi uji. Harga EC_{50} pada quersetin sebesar 2,702 $\mu\text{g/ml}$, fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) sebesar 249,31 $\mu\text{g/ml}$. Terdapat perbedaan yang bermakna harga EC_{50} antara quersetin dan fraksi eter hasil hidrolisis infusa daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis),

SARAN

Perlu dilakukan penelitian tentang aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH dengan

menggunakan penyarian yang lain dan metode lain, selain DPPH.

DAFTAR PUSTAKA

- Chuang, M. T., Lin, Y. S., Hou, W. C. 2007. Ancordin The Major Rhizome Protein Of Madeira vine, With Trypsin Inhibitory and Stimulatory Activities in Nitrit Oxide Production. *Peptides*. 28 (6):1311-6.
- Dalimartha dan Soediby, M. 1999. *Awet Muda dengan Tumbuhan Obat dan Diet Suplemen*. 1-8. Trubus Agriwidya. Semarang.
- Hanasakti, Y., Ogawa, S., Fukui, S. 1994. *The Corelation Between Active Oxygen, Scaveging and Antioxidantive Effect of Flavonoids, Free Radical Biol. Med.*, 16: 845-850.
- Hernani dan Rahardjo. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Cetakan Pertama. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Kumalaningsih. 2006. *Antioksidan Alami. Penangkal Radikal Bebas*. 3-22. Trubus Agrisarana. Surabaya.
- Moura-Letts, G., Villegas, L. F., Marcalo, A., Vaisberg, A. J., Hammon, G. B. 2006. In Vivo Wound-Healing Activity of Oleanolic Acid Derived from The Acid Hydrolysis of Anredera Diffusa. *J. Nat. Prod.* Jun. 69 (6): 978-9.
- Rachmawati, S. 2008. *Studi Makroskopi, Mikroskopi dan Skrining Fitokimia Daun Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. Thesis. Airlangga University. Surabaya.
- Son and Lewis. 2002. Free Radical Scavenging and Antioxidative Activity of Coffeic Acid Amide and Ester Analoges; Structur Activity Relationship. *J. Agric. Food Chemi.* 50. 469. Cornell University. Ithaca. New York.
- Sunarni, T., Suwidjiyo Pramono dan Ratna Asmah. 2007. *Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel*

(*Stelechocarpus burahol* (Bl.) Hook f. & Th.).
Majalah Farmasi Indonesia. 18 (3). 111-116.

Suryanto Edy, Raharjo, S., Trenggono and
Sastrohanodjojo. 2003. *Singlet Oxygen
Quenching Effect of Andaliman
(Zanthoxylum acanthopodium DC) Extract
In Light-Induced Lipid Oxidation, Final
Report Research Grant 9th Award (2002)*

Research Project Period (February-
December 2003). 330. Universitas Gadjah
Mada. Yogyakarta.

Yang, R.Y., Shou Lin, George Kuo. 2008.
Original Article Content and Distribution
of Flavonoid Among 91 Edible Plant
Species. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 17 (S1).
275-279.

