

Penentuan Total Fenolik, Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer)

Mustika Furi^{1*}, Nursinta Al Basit¹, Ihsan Ikhtiarudin¹, Rahayu Utami¹

Artikel Penelitian

Abstract: Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) is plant that belongs to family Lytheraceae which has been used as traditional medicine. Determination of total phenolic and total flavonoid content as well as antioxidant activity of extract and fractions of its leaves have been conducted by colorimetric method using photometric measurements. The Folin Ciocalteu and gallic acid was used as reagent and standard for total phenolic determination, meanwhile $AlCl_3$ and quercetin was prepared for total flavonoid content test. Antioxidant activity assay was performed using DPPH free radical scavenging method. Based on the result, it showed that ethyl acetate fraction afforded the highest total phenolic and total flavonoid content with values of 232 mgGAE/g and 180 mgQE/g, respectively. As for the antioxidant activity, the ethyl acetate fractions also demonstrated the most potential activity among others fraction and extract with IC_{50} value of 12,47 μ g/mL.

Keywords: kedabu leaves (*Sonneratia ovata* Backer), total phenolic, total flavonoids, antioxidant

¹Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Riau, Pekanbaru 28928, Indonesia

Korespondensi:

Mustika Furi
mustikafuri@stifar-riau.ac.id

Abstrak: Tumbuhan kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) merupakan famili Lytheraceae yang dikalangan masyarakat telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Penentuan total fenolik, total flavonoid dan uji aktivitas antioksidan telah dilakukan terhadap ekstrak dan fraksi daun kedabu yang ditentukan dengan metode kolorimetri dengan pengukuran secara fotometri. Penentuan total fenolik menggunakan baku asam galat dengan metode Folin Ciocalteu dan penentuan total flavonoid menggunakan baku kuersetin dengan metode pembentukan kompleks $AlCl_3$. Penentuan Aktivitas antioksidan menggunakan metode uji penangkapan radikal bebas DPPH. Berdasarkan hasil pengujian terhadap ekstrak dan fraksi diperoleh hasil bahwa fraksi etil asetat mempunyai nilai total fenolik dan flavonoid tertinggi yaitu sebesar 232 mgGAE/g, dan 180 mgQE/g. Penentuan aktivitas antioksidan ditentukan dengan uji penangkapan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), diperoleh hasil pada fraksi etil asetat memiliki nilai IC_{50} 12,47 μ g/mL lebih baik dari ekstrak dan fraksi lainnya dengan kategori sangat kuat.

Kata kunci: Daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer), Total Fenolik, Total Flavonoid, Antioksidan

Pendahuluan

Tumbuhan bakau di Indonesia merupakan yang terbanyak di dunia, baik dari segi kuantitas area, maupun jumlah spesies. Bakau memiliki banyak manfaat bagi kehidupan manusia, mulai dari manfaat ekologi hingga sebagai sumber pangan dan obat. Indonesia memiliki 50 jenis bakau, beberapa diantaranya yaitu genus *Rhizophora*, *Bruguiera*, *Avicennia*, *Sonneratia*, *Xylocarpus*, *Barringtonia*, *Lumnitzera*, dan *Ceriops* (1).

Genus *Sonneratia* merupakan genus endemik di wilayah indo-barat pasifik. Genus ini merupakan elemen terdepan di muara bakau dan teluk yang terdapat di pantai tropis Afrika Timur hingga Indo-Malaysia, Cina Selatan, New Guinea, Australia, dan pulau-pulau di Pasifik Barat. *Sonneratia* memiliki sembilan spesies yaitu *Sonneratia alba*, *S. apetala*, *S. caseolaris*, *S. griffithii*, *S. gulngai*, *S. hainanensis*, *S. lanceolata*, *S. ovata*, dan *S. urama* (2)

Bagian buah, kulit kayu, dan daun dari spesies *Sonneratia* telah digunakan dalam obat tradisional untuk mengobati penyakit seperti asma, obat penurun panas, bisul, hepatitis, ambeien, keseleo, dan pendarahan (3). Salah satu tumbuhan bakau dari genus *Sonneratia* yang terkenal adalah perepat (*Sonneratia alba*) yang memiliki potensi sebagai senyawa antioksidan. Hal ini dinyatakan dalam penelitian (4), ekstrak etil asetat dan metanol daun perepat pada konsentrasi 500 µg/mL dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai persen inhibisi berturut-turut sebesar 64,69 dan 73,44 %. Buah perepat mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, tanin, dan steroid.

Selain perepat (*Sonneratia alba*), bakau lainnya yang telah banyak diteliti adalah pedada (*Sonneratia caseolaris*). Ekstrak metanol daun pedada memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan nilai IC_{50} nya sebesar 68 µg/mL (5). Pada penelitian lainnya, isolat daun pedada terbukti memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 45,85 µg/mL (6).

Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) adalah salah satu spesies dari *Sonneratia* yang belum banyak dilakukan penelitian. Kedabu (*Sonneratia*

ovata Backer) dikategorikan sebagai tumbuhan langka menurut IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) dengan status kelangkaan *near threatened* (terancam). Pada buah kedabu terdapat senyawa yang menunjukkan aktivitas sitotoksik yaitu (-)-(R)-nyasol, (-)-(R)-4'-O-metilnyasol dan asam maslinat. Ekstrak metanol kulit batang kedabu mengandung senyawa triterpenoid yaitu 3β-asetoksi-lup-20(29)-en-2α-ol (7). Kulit batang kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) mengandung senyawa β-sitosterol dan stigmasterol (5).

Daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) mengandung tiga fenolik baru, sonnerfenolik A, sonnerfenolik B, dan sonnerfenolik C, sebuah serebrosida baru, sonnerserebrosida bersama dengan sembilan belas senyawa, termasuk sembilan lignan, dua steroid, dua triterpenoid, tiga turunan asam galat, dua turunan fenolik dan 1-O-benzil-β-D-glukopiranosida. Diantara 15 senyawa yang diuji, (S)-*rhodolouchol* menunjukkan penghambatan terhadap AChE (asetilkolinesterase). Tiga dari senyawa yang telah berhasil diisolasi tersebut menunjukkan sitotoksitas terhadap garis sel MCF-7 (*human breast cancer*) (3).

Berdasarkan pengujian fitokimia yang telah dilakukan, ekstrak etanol daun kedabu memiliki kandungan senyawa fenolik, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid. Senyawa fenolik dan flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak memiliki potensi sebagai aktivitas antioksidan yang mampu meredam dampak radikal bebas.

Berdasarkan uraian di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penentuan total fenolik dan flavonoid secara kolorimetri dengan pengukuran secara fotometri terhadap ekstrak dan fraksi daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) serta melakukan uji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

Bahan dan Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan analitik, tabung reaksi, plat tetes, pipet tetes, corong pisah, *beaker glass*, corong, oven, vial, labu ukur, satu set alat *rotary evaporator*

(Buchi 461 Water Bath), 96 *well microplate* (Costar 3596), *microplate reader* 96 (Epoch BioTek) dan pipet mikro *multichannel* (Nexty).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kedabu, etanol, etil asetat, *n*-heksana, akuades, asam asetat anhidrat, asam sulfat (H_2SO_4) pekat, kloroform, kloroform amoniak 0,05 N, asam klorida (HCl) pekat, logam magnesium (Mg), larutan besi (III) klorida ($FeCl_3$) 1%, asam sulfat (H_2SO_4) 2 N, norit, pereaksi Mayer, asam galat, reagen Folin-Ciocalteu 0,2 N, natrium hidroksida (NaOH) 1%, kuersetin, natrium asetat (CH_3COONa) 1 M, aluminium (III) klorida ($AlCl_3$) 10%, asam askorbat, metanol, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Kedabu

Pembuatan ekstrak dimulai dengan melakukan pembuatan serbuk simplisia kering dari daun kedabu dari 2 Kg daun kedabu segar. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi atau perendaman dengan pelarut etanol. Serbuk simplisia kering sebanyak 500 g dimasukkan ke dalam botol berwarna gelap kemudian dimaserasi dengan etanol hingga sampel terendam seluruhnya. Wadah maserasi disimpan pada suhu kamar dan terlindungi dari cahaya matahari langsung. Proses perendaman tersebut berlangsung selama lima hari sambil sesekali diaduk. Sari etanol disaring menggunakan kapas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cara yang sama hingga tiga kali pengulangan. Hasil maserasi dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Alat diatur pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental daun kedabu, kemudian ekstrak dikumpulkan dan ditimbang.

Fraksinasi Ekstrak Etanol Daun Kedabu

Sebanyak 25 g ekstrak kental etanol daun kedabu kemudian dilarutkan dengan 50 mL akuades, kemudian diaduk homogen dan dimasukkan ke dalam corong pisah, lalu tambahkan 50 mL *n*-heksana ke dalam corong pisah tersebut. Campuran larutan dikocok hingga terekstraksi sempurna, didiamkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas (lapisan *n*-heksana) dipisahkan, sedangkan lapisan airnya difraksinasi kembali dengan *n*-

heksana didalam corong pisah dengan prosedur yang sama (3-5 kali pengulangan). Lapisan *n*-heksana tersebut dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Kemudian berat fraksi *n*-heksana tersebut ditimbang.

Lapisan air kemudian difraksinasi dengan etil asetat sebanyak 50 mL menggunakan corong pisah dan dilakukan prosedur yang sama seperti pada fraksinasi menggunakan *n*-heksana. Lapisan etil asetat dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* kemudian berat fraksi etil asetat yang diperoleh ditimbang. Fraksinasi dengan *n*-butanol dilakukan dengan menggunakan prosedur yang sama untuk mendapatkan fraksi *n*-butanol.

Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi

Masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang sebanyak 0,1 g dan dilarutkan dalam 10 mL etanol. Campuran larutan ini selanjutnya ditambahkan 5 mL air suling dan 5 mL kloroform (1:1) di dalam tabung reaksi, lalu dikocok kuat dan dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan yakni lapisan air (bagian atas) dan lapisan kloroform (bagian bawah). Kedua lapisan tersebut dipisahkan. Lapisan air digunakan untuk uji saponin, fenolik, dan flavonoid. Sedangkan lapisan kloroform digunakan untuk uji senyawa terpenoid dan steroid. Untuk uji alkaloid dilakukan dengan prosedur tersendiri.

1. Uji Fenolik

Beberapa tetes lapisan air diambil dan dimasukkan ke dalam plat tetes ditambahkan 1-2 tetes larutan besi (III) klorida 1%. Bila terbentuk warna biru menunjukkan adanya senyawa fenolik.

2. Uji Flavonoid

Sebanyak 1-2 tetes lapisan air diambil dan dimasukkan ke dalam plat tetes ditambahkan sedikit logam Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Bila terbentuk warna kuning-jingga sampai merah menandakan adanya senyawa flavonoid.

3. Uji Saponin

Lapisan air dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dikocok kuat selama beberapa saat.

Apabila terbentuk busa yang bertahan selama 5 menit, berarti menunjukkan adanya saponin.

4. Uji Terpenoid dan Steroid

Lapisan kloroform disaring melalui pipet yang diberi kapas dan norit, kemudian hasil saringan dipipet sebanyak 2-3 tetes ke dalam 3 lubang plat tetes dan dibiarkan mengering. Setelah kering pada lubang 1 ditambahkan asam asetat anhidrat, lubang 2 ditambahkan asam sulfat pekat dan lubang 3 ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat). Jika terbentuk warna merah menandakan adanya senyawa terpenoid dan jika terbentuk warna hijau atau biru pada lubang menandakan adanya senyawa steroid.

5. Uji Alkaloid

Masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang sebanyak 500 mg ditambahkan 5 mL kloroform, digerus dan ditambahkan 5 mL kloroform amoniak, gerus kembali kemudian disaring. Ke dalam tabung reaksi ditambahkan 1 mL asam sulfat 2 N, kocok, biarkan hingga terbentuk 2 lapisan. Ambil lapisan asam (atas) lalu tambahkan 1 sampai 2 tetes pereaksi Mayer dalam tabung reaksi. Terbentuknya endapan putih menandakan adanya senyawa alkaloid.

Penentuan Kadar Total Fenolik (KTF_e)

Penentuan kadar fenolik ditentukan dengan metode kolorimetri pengukuran menggunakan microplate readers sesuai dengan (8), dengan cara sebagai berikut ekstrak dan masing-masing fraksi daun kedabu ditimbang tepat 10 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan tersebut kemudian dipipet 100 µL ke dalam well pada baris A. Kemudian sebanyak 50 µL metanol ditambahkan ke baris B dan C, lalu dipipet sebanyak 50 µL dari baris A ke baris B, baris B dipipet 50 µL ditambahkan ke baris C, baris C dipipet sebanyak 50 µL dan dibuang. Sehingga diperoleh konsentrasi uji pada baris A (1000 µg/mL), B (500 µg/mL) dan C (250 µg/mL). Kemudian pada masing-masing konsentrasi ditambahkan 75 µL reagen Folin-Ciocalteu 0,2 N. Diamkan selama 8 menit, tambahkan 60 µL NaOH 1% dan diamkan

campuran tersebut selama 1 jam pada suhu ruang dan terhindar dari cahaya matahari. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 730 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Sebagai standar digunakan senyawa asam galat. Lakukan pengukuran blangko dengan cara yang sama, tanpa penambahan larutan uji. Kandungan fenolik total dinyatakan dalam miligram ekivalen asam galat tiap gram berat ekstrak/fraksi (b/b; mgGAE/g)

Penentuan Kadar Total Flavonoid (KTF)

Penentuan kadar flavonoid total ditentukan dengan metode kolorimetri pengukuran menggunakan microplate readers sesuai dengan (9) dengan cara masing-masing ekstrak dan fraksi daun kedabu ditimbang tepat 10 mg lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan etanol sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Larutan tersebut dipipet 100 µL ke dalam well pada baris A. Kemudian sebanyak 50 µL etanol ditambahkan ke baris B dan C, lalu dipipet sebanyak 50 µL dari baris A ke baris B, baris B dipipet 50 µL ditambahkan ke baris C, baris C dipipet sebanyak 50 µL dan dibuang. Sehingga diperoleh konsentrasi uji pada baris A (1000 µg/mL), B (500 µg/mL) dan C (250 µg/mL). Kemudian pada masing-masing konsentrasi ditambahkan 10 µL AlCl₃ 10%, 135 µL etanol 96% dan 10 µL natrium asetat 1 M. Kemudian diamkan campuran tersebut selama 40 menit pada suhu ruang dan terhindar dari cahaya matahari. Selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang 430 nm. Pengukuran absorbansi dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. Sebagai standar digunakan senyawa kuersetin. dilakukan pengukuran blangko yang berisi semua pereaksi yang digunakan akan tetapi tidak mengandung kuersetin dan sampel uji. Kandungan flavonoid total dinyatakan sebagai miligram ekivalen kuersetin tiap gram ekstrak (b/b; mgQE/g)

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan menggunakan metode DPPH sesuai dengan (10) dengan cara berikut : masing-masing ekstrak dan fraksi ditimbang tepat 10 mg lalu dimasukkan ke

dalam labu ukur gelap 10 mL, kemudian tambahkan metanol sampai tanda batas sehingga diperoleh larutan induk dengan konsentrasi 1000 µg/mL. Sebanyak 1 mL larutan tersebut dipipet ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan metanol hingga tanda batas untuk memperoleh larutan uji dengan konsentrasi 100 µg/mL. Larutan uji dibuat dengan 6 variasi konsentrasi yaitu 100; 50; 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 µg/mL. Pengenceran bertingkat dilakukan pada 96 well microplate.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan microplate reader, *two fold dilution* dengan metode DPPH. Sebanyak 100 µL larutan masing-masing sampel dengan konsentrasi 100 µg/mL dipipet ke dalam baris A, kemudian baris B sampai H dimasukkan metanol sebanyak 50 µL. Lalu pada baris A dipipet 50 µL ditambahkan ke baris B, baris B dipipet 50 µL ditambahkan ke baris C, baris C dipipet 50 µL ditambahkan ke baris D dan dilakukan sampai baris F. Baris F dipipet 50 µL lalu dibuang, sehingga diperoleh konsentrasi larutan uji 100 µg/mL (baris A), 50 µg/mL (baris B), 25 µg/mL (baris C), 12,5 µg/mL (baris D), 6,25 µg/mL (baris E), dan 3,125 µg/mL (baris F). Baris A sampai G ditambahkan DPPH sebanyak 80 µL dengan konsentrasi 80 µg/mL, baris H ditambahkan metanol sebagai blanko. Dilakukan perlakuan yang sama untuk kontrol positif yaitu vitamin C dengan konsentrasi 100; 50; 25; 12,5; 6,25; dan 3,125 µg/mL. Selanjutnya didiamkan selama 30 menit pada suhu ruang, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan *microplate reader*.

Sebagai pembanding digunakan vitamin C yang sudah diketahui sebagai antioksidan.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persen % inhibisi dihitung dengan rumus

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100\%$$

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% atau IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%.

Hasil dan Diskusi

Sampel segar dari daun kedabu disortasi basah, kemudian daun kedabu dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya sampel dikeringkan dengan tujuan untuk mengurangi kadar air yang terdapat dalam sampel agar sampel tidak ditumbuhi jamur. Setelah sampel daun kering, dilakukan sortasi kering sehingga diperoleh sampel daun kering sebanyak 0,8 kg, kemudian dirajang untuk memperluas permukaan sampel agar kontak antar sampel dengan pelarut menjadi lebih luas sehingga senyawa yang berada dalam sampel lebih mudah tersari oleh pelarut yang digunakan. Sebelum dilakukan ekstraksi, dilakukan skrining fitokimia terlebih dahulu terhadap daun kedabu kering untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun kedabu kering secara kualitatif.

Sebanyak 500 g serbuk kering simplisia diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol. Pemilihan proses maserasi dikarenakan metode ini merupakan penyarian yang sederhana dan dapat menarik zat yang terdapat didalam simplisia baik simplisia yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan serta tidak membutuhkan perlakuan khusus dalam pengerjaannya. Pemilihan pelarut etanol dikarenakan pelarut etanol merupakan pelarut yang bersifat universal yaitu pelarut yang dapat menarik senyawa yang bersifat polar hingga nonpolar, dan juga untuk mendapatkan ekstrak total dari sampel yang digunakan. Proses maserasi pada penelitian kali ini dilakukan selama 5 hari dengan 3 kali pengulangan. Tujuan perendaman selama 5 hari dengan 3 kali pengulangan adalah untuk memperpanjang waktu kontak antara pelarut dengan sampel sehingga proses penyarian lebih optimal. Pelarut masuk ke dalam dinding sel sampel dan terjadi perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel yang dapat menyebabkan pecahnya dinding sel sampel dan zat aktif terlarut dalam pelarut. Selanjutnya dilakukan penyaringan untuk memisahkan maserat dari residu. Maserat yang diperoleh dipisahkan menggunakan rotary evaporator. Penggunaan rotary evaporator bertujuan untuk memisahkan

pelarut etanol dari maserat atau ekstrak cair sehingga didapatkan ekstrak kental etanol berwarna coklat kehitaman sebanyak 42,572 g dengan persen rendemen sebesar 8,5 %.

Selanjutnya ekstrak difraksinasi untuk untuk memisahkan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak berdasarkan tingkat kepolarannya. Ekstrak tersebut difraksinasi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair (ECC). Metode ekstraksi cair-cair merupakan metode pemisahan yang paling sederhana dengan prinsip kerjanya adalah pemisahan senyawa dengan berdasarkan pada derajat kepolaran senyawa tersebut (11)

Fraksinasi dilakukan menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda berdasarkan derajat kepolaran pelarutnya. Fraksinasi dimulai dari pelarut *n*-heksana untuk menarik senyawa-senyawa non polar yang terdapat pada ekstrak. Kemudian fraksinasi dilanjutkan dengan etil asetat yang bersifat semi polar untuk menarik senyawa senyawa-senyawa semi polar yang terkandung dalam ekstrak dan *n*-butanol yang bersifat polar untuk menarik senyawa-senyawa yang lebih polar yang terkandung dalam ekstrak. Proses tersebut dilakukan sampai beberapa kali pengulangan agar proses pemisahannya lebih efektif (Hanani, 2015). Hasil fraksinasi ekstrak

etanol daun kedabu diperoleh fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan *n*-butanol dengan % rendemen berturut-turut sebesar 3,18 %; 1,10 % dan 0,89 %.

Setelah dilakukan ekstraksi dan fraksinasi, maka dilakukan skrining fitokimia terhadap fraksi agar diketahui gambaran secara kualitatif tentang golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam masing-masing fraksi tersebut. Hasil skrining fitokimia pada sampel segar dan sampel kering daun kedabu menunjukkan kandungan metabolit sekunder yang sama, yaitu mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid dan terpenoid. Sedangkan pada ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid. Selanjutnya pada fraksi *n*-butanol positif mengandung fenolik, flavonoid dan terpenoid (**Tabel 1**). Pada skrining fitokimia dapat diketahui bahwa senyawa terpenoid tumbuhan kedabu ini selain berada pada kelarutannya yang non polar seperti *n*-heksana, terdapat pula pada fraksi etil asetat dan *n*-butanol yang kelarutannya lebih tinggi / polar. Hal ini disebabkan oleh gugus gula yang terikat pada senyawa terpenoid dan steroid tersebut yang mengakibatkan senyawa tersebut lebih polar (12)(13).

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Sampel, Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer)

| Kandungan Kimia | Hasil Pengamatan | | | | | |
|-----------------|------------------|---------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------------|
| | Sampel Segar | Sampel Kering | Ekstrak Etanol | Fraksi <i>n</i> -heksana | Fraksi Etil Asetat | Fraksi <i>n</i> -butanol |
| Fenolik | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Flavonoid | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Terpenoid | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) |
| Steroid | (-) | (-) | (+) | (-) | (+) | (-) |
| Alkaloid | (+) | (+) | (+) | (+) | (+) | (-) |
| Saponin | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) | (-) |

Ket : (+): teridentifikasi mengandung senyawa; (-) : Tidak teridentifikasi mengandung senyawa

Penentuan total fenolik dilakukan menggunakan metode Folin-Ciocalteu. Reagen Folin-Ciocalteu mengandung campuran natrium tungstat, natrium molibdat, litium sulfat, asam

klorida pekat, asam fosfat 8%, bromin dan aquadest. Reagen Folin-Ciocalteu digunakan karena reagen tersebut dapat beraksi dengan senyawa fenolik membentuk larutan berwarna

yang dapat diukur absorbansinya. Prinsip metode Folin-Ciocalteu adalah terbentuknya senyawa kompleks yang berwarna biru yang dapat diukur pada panjang gelombang 730 nm. Pereaksi ini mengoksidasi dan mereduksi fosfotungstat-fosfomolibdat yang terdapat pada pereaksi Folin-Ciocalteu menjadi suatu kompleks molibdenum tungstat. Senyawa fenolik bereaksi dalam suasana basa agar terjadi disosiasi proton pada senyawa fenolik menjadi ion fenolat (14)(15). Oleh karena itu, digunakan sodium hidroksida untuk menciptakan suasana basa agar reaksi tersebut dapat berlangsung.

Baku pembanding (standar) yang digunakan pada penentuan kadar total fenolik adalah asam galat karena senyawa ini merupakan turunan dari asam hidroksi benzoat yang tergolong asam fenol sederhana (14). Pada penentuan kadar total fenolik dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum asam galat sehingga diperoleh panjang

gelombang maksimum 730 nm. Kemudian kurva kalibrasi asam galat dibuat dengan mengukur absorbansi larutan asam galat pada seri konsentrasi 100; 80; 60; 40; dan 20 µg/mL. Persamaan regresi linier $y = 0,0089x - 0,0479$ dengan nilai $R^2 = 0,9905$ diperoleh dengan memplotkan variasi konsentrasi larutan asam galat (sumbu x) dengan nilai absorbansi asam galat (sumbu y) (**Gambar 1**).

Berdasarkan persamaan tersebut, diperoleh kadar total fenolik dari ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol daun kedabu masing-masing sebesar 76 mgGAE/g ekstrak; 80 mgGAE/g fraksi; 232 mgGAE/g fraksi dan 130 mgGAE/g fraksi (**Tabel 2**). Kandungan total fenolik dalam ekstrak atau fraksi dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan mg asam galat dalam 1 g sampel.

Tabel 2. Hasil Penentuan Kadar Total Fenolik Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer)

| Sampel Uji | Abs ± SD | Kadar Total Fenolik (KTFe) |
|--------------------|---------------|----------------------------|
| Ekstrak Etanol | 0,630 ± 0,004 | 76 mgGAE/g |
| Fraksi n-heksana | 0,663 ± 0,008 | 80 mgGAE/g |
| Fraksi Etil Asetat | 0,470 ± 0,009 | 232 mgGAE/g |
| Fraksi n-butanol | 0,531 ± 0,008 | 130 mgGAE/g |

Fenolik merupakan senyawa yang berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan sehingga diharapkan tumbuhan yang memiliki kandungan metabolit sekunder fenolik yang tinggi juga akan memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Semakin besar kandungan total senyawa fenolik dari suatu tumbuhan maka akan semakin besar efek antioksidan yang dimiliki oleh tumbuhan tersebut. Semakin besar senyawa fenolik dalam suatu sampel, maka intensitas warna biru yang dihasilkan akan semakin pekat dan absorbansinya juga akan meningkat (16).

Penentuan total flavonoid dilakukan dengan menggunakan metode kolorimetri menggunakan reagen $AlCl_3$. Penetapan kadar total flavonoid didasarkan pada pembentukan kompleks antara $AlCl_3$ dengan senyawa flavonoid pada gugus orto

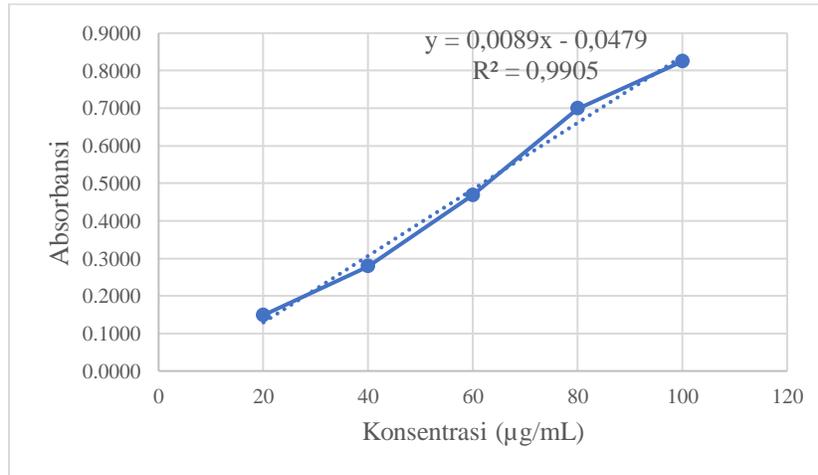
hidroksi keton. Baku pembanding yang digunakan dalam analisis kadar flavonoid ini adalah kuersetin. Kuersetin digunakan sebagai pembanding karena kuersetin merupakan kelompok senyawa flavonol terbesar (17). Larutan standar kuersetin pada konsentrasi 100; 80; 60; 40 dan 20 µg/mL diukur serapannya dengan microplate reader pada panjang gelombang 430 nm. Persamaan regresi $y = 0,0074x + 0,0128$ dengan nilai $R^2 = 0,9948$ diperoleh dengan memplotkan konsentrasi kuersetin (sumbu x) terhadap absorbansinya (sumbu y) (**Gambar 2**).

Berdasarkan persamaan tersebut, diperoleh kadar total flavonoid dari ekstrak etanol daun kedabu, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol masing-masing sebesar 76

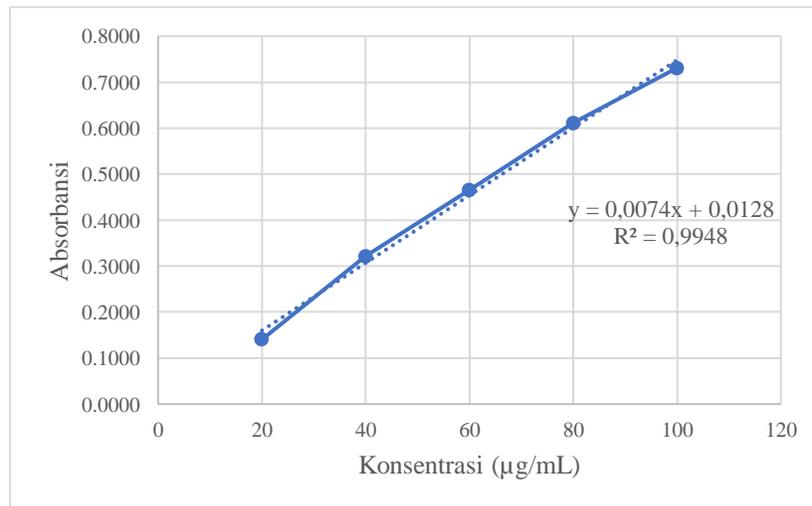
mgQE/g ekstrak; 160 mgQE/g fraksi; 180 mgQE/g fraksi dan 172 mgQE/g fraksi (**Tabel 3**).

Kandungan total flavonoid dalam ekstrak atau fraksi dinyatakan dalam QE (*Quercetin*

Equivalent) yaitu jumlah kesetaraan mg kuersetin dalam 1 g sampel. Semakin banyak kadar total flavonoid yang terkandung dalam suatu ekstrak maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya.



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Asam Galat



Gambar 2. Kurva Kalibrasi Kuersetin

Uji aktivitas antioksidan terhadap ekstrak dan fraksi daun kedabu dengan menggunakan metode penangkapan radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Metode ini dipilih karena dalam pengerjaannya lebih sederhana, mudah, peka, ekonomis dan menggunakan sampel yang sedikit untuk evaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa

bahan alam sehingga digunakan secara luas untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor elektron serta metode yang paling sering digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan dari ekstrak tanaman. Prinsip dari metode ini yaitu dimana elektron yang tidak berpasangan pada molekul DPPH yang

berwarna ungu akan berubah menjadi kuning lemah apabila elektron yang tidak berpasangan

tersebut berikatan dengan atom hidrogen yang disumbangkan oleh senyawa antioksidan (18).

Tabel 3. Hasil Penentuan Kadar Total Flavonoid Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer)

| Sampel Uji | Abs ± SD | Kadar Total Fenolik (KTFe) |
|--------------------------|---------------|----------------------------|
| Ekstrak Etanol | 0,157 ± 0,002 | 76 mgQE/g |
| Fraksi <i>n</i> -heksana | 0,311 ± 0,003 | 160 mgQE/g |
| Fraksi Etil Asetat | 0,345 ± 0,006 | 180 mgQE/g |
| Fraksi <i>n</i> -butanol | 0,328 ± 0,003 | 172 mgQE/g |

Pengukuran Antioksidan dilakukan dengan mengukur nilai absorbansi yang terukur pada panjang gelombang 517 nm karena pada panjang gelombang tersebut larutan DPPH dapat menyerap sinar UV secara maksimal. Selanjutnya dilakukan perhitungan nilai persen inhibisi untuk tiap konsentrasi larutan uji (9).

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan DPPH melalui persen inhibisi. Persen inhibisi pada peredaman radikal bebas merupakan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi sampel yang diuji. Semakin besar persentase inhibisi sampel maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Semakin tinggi nilai aktivitas antioksidan suatu sampel maka semakin kecil nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ adalah singkatan dari *Inhibition Concentration* 50 yang merupakan konsentrasi suatu sampel yang diperlukan untuk menghambat aktivitas radikal bebas sebanyak 50%. Nilai IC₅₀ diperoleh dari suatu persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi ekstrak/fraksi uji dengan persen hambatan radikal. Aktivitas antioksidan lebih baik jika nilai IC₅₀ lebih kecil karena hanya diperlukan konsentrasi rendah untuk dapat menghambat aktivitas radikal bebas sebanyak 50%. Secara spesifik dikatakan suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai IC₅₀ < 50 µg/mL, kuat jika memiliki nilai IC₅₀ 50-100 µg/mL, sedang jika memiliki nilai IC₅₀ 101-250 µg/mL, lemah jika memiliki nilai IC₅₀ 251-500 µg/mL dan tidak aktif jika memiliki IC₅₀ > 500 µg/mL (18).

Hasil pengujian diperoleh persen inhibisi ekstrak etanol daun kedabu pada 100 µg/mL adalah 88,13 % dengan nilai IC₅₀ sebesar 20,86 µg/mL. Fraksi *n*-heksana memberikan persen inhibisi pada 100 µg/mL sebesar 86,87 % dengan nilai IC₅₀ sebesar 17,27 µg/mL. Fraksi etil asetat memberikan persen inhibisi pada 100 µg/mL sebesar 90,15 % dengan nilai IC₅₀ sebesar 12,47 µg/mL. Dan fraksi *n*-butanol pada 100 µg/mL memberikan persen inhibisi sebesar 88,13 % dengan nilai IC₅₀ sebesar 15,10 µg/mL. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan terbaik terhadap radikal bebas DPPH diikuti oleh fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol. Sedangkan vitamin C sebagai antioksidan pembanding memiliki nilai IC₅₀ sebesar 14,54 µg/mL (**Tabel 4**). Berdasarkan perhitungan IC₅₀ tersebut diketahui bahwa baik ekstrak, fraksi maupun vitamin C memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat (< 50 µg/mL).

Sebagai pembanding digunakan vitamin C yang sudah diketahui sebagai antioksidan kategori sangat kuat. Hasil pengukuran vitamin C menunjukkan bahwa vitamin C mempunyai nilai IC₅₀ sebesar 14,54 µg/mL. Namun, fraksi etil asetat daun kedabu memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan vitamin C. Sedangkan fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-heksana dan ekstrak etanol daun kedabu memiliki aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan dengan vitamin C sebagai antioksidan pembanding.

Nilai IC₅₀ yang diperoleh terlihat bahwa fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, diduga hal ini dikarenakan banyaknya kandungan metabolit sekunder berupa senyawa fenolik. Sesuai dengan pernyataan (3), daun kedabu mengandung banyak senyawa fenolik yang telah berhasil diisolasi seperti sonnerfenolik A, sonnerfenolik B, sonnerfenolik C, tiga turunan asam galat serta dua turunan fenolik lainnya. Senyawa fenolik merupakan antioksidan alami. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa fenolik memiliki peran yang cukup signifikan sebagai penyumbang antioksidan, sedangkan sisanya dipengaruhi oleh senyawa lain. Begitu pula dengan senyawa flavonoid juga berperan dalam besarnya aktivitas

antioksidan yang dimiliki suatu senyawa. Hal ini dikarenakan senyawa flavonoid dan fenolik memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbon yang memiliki ikatan rangkap terkojugasi, sehingga gugus hidroksil tersebut dapat dengan mudah mendonorkan atom hidrogen kepada radikal bebas. Sehingga semakin banyaknya kandungan senyawa flavonoid dan fenolik suatu tumbuhan maka akan semakin besar pula aktivitas antioksidan. Dari hasil penentuan total fenolik dan flavonoid dapat diketahui bahwa fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol merupakan dua fraksi yang memiliki kadar total fenolik dan flavonoid tertinggi diikuti dengan aktivitas antioksidannya yang terbaik.

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Kedabu (*Sonneratia ovata* Backer)

| Sampel Uji | Nilai IC ₅₀ | Kategori Antioksidan |
|--------------------------|------------------------|----------------------|
| Ekstrak Etanol | 20,86 µg/mL | Sangat Kuat |
| Fraksi <i>n</i> -heksana | 17,27 µg/mL | Sangat Kuat |
| Fraksi Etil Asetat | 12,47 µg/mL | Sangat Kuat |
| Fraksi <i>n</i> -butanol | 15,10 µg/mL | Sangat Kuat |
| Vitamin C | 14,54 µg/mL | Sangat Kuat |

Aktivitas antioksidan pada fraksi *n*-heksana dikategorikan sangat kuat setelah fraksi etil asetat dan fraksi *n*-butanol. Hal ini diduga karena pada fraksi *n*-heksana mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, steroid, fenolik maupun flavonoid yang sangat mendukung aktivitas antioksidan didalamnya. Beberapa senyawa alkaloid diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan, contohnya alkaloid indol yang memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi berantai radikal bebas secara efisien (19). Selain itu, triterpenoid atau steroid merupakan senyawa yang juga memiliki peranan sebagai antioksidan. Mekanisme antioksidan dari triterpenoid adalah dengan cara menangkap/*scavenging* spesies reaktif, misalnya superoksida, dan mengkelat logam (Fe²⁺ dan Cu²⁺). Mekanisme aksi antara antioksidan dan DPPH tergantung pada

konformasi struktur antioksidan. Pada umumnya aktivitas antioksidan meningkat dengan peningkatan jumlah gugus hidroksil (-OH) atau gugus yang dapat mendonasikan H seperti -NH atau -SH dalam struktur molekul suatu senyawa (20).

Ekstrak etanol daun kedabu mendapatkan hasil paling rendah diantara seluruh sampel baik untuk kadar total fenolik dan flavonoid maupun aktivitas antioksidannya. Aktivitas antioksidannya berada dibawah vitamin C meskipun aktivitasnya sebagai antioksidan dikategorikan sangat kuat. Hal ini dikarenakan dalam ekstrak masih dalam bentuk campuran beberapa senyawa yang tidak memiliki aktivitas antioksidan ataupun terdapat senyawa yang dapat menghambat aktivitas antioksidan itu sendiri.

Berdasarkan hasil penelitian ini, fraksi etil asetat daun kedabu memiliki kadar total fenolik dan flavonoid yang paling tinggi diantara semua sampel, diikuti oleh fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-heksan dan ekstrak etanol. Hal ini sebanding dengan kekuatan aktivitas antioksidan yang dihasilkan pada pengujian dengan menggunakan metode DPPH yaitu untuk aktivitas paling kuat terdapat pada fraksi etil asetat daun kedabu dan berikutnya diikuti oleh fraksi *n*-butanol, fraksi *n*-heksan dan ekstrak etanol. Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Senyawa antioksidan ini bersifat multifungsional karena dapat bereaksi sebagai penangkap radikal bebas, pengkelat logam dan peredam terbentuknya singlet oksigen.

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat daun kedabu (*Sonneratia ovata* Backer) memiliki kadar total fenolik dan total flavonoid dengan nilai tertinggi berturut-turut yaitu 232 mgGAE/g dan 180 mgQE/g. Aktivitas antioksidan yang paling baik juga ditunjukkan oleh fraksi etil asetat dengan kategori aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ 12,5 µg/mL.

Referensi

1. Ragavan P, Saxena A, Jayaraj RSC, Mohan PM, Ravichandran K, Saravanan S, et al. A review of the mangrove floristics of India. *Taiwania*. 2016;61(3):224–42.
2. Duke N. Australia's mangroves. The authoritative guide to Australia's mangrove plants. Univ Queensl Norman C Duke [Internet]. 2006; Available from: http://www.mangrovetwatch.org.au/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=97&Itemid=300286
3. Nguyen T-H-T, Pham H-V-T, Pham N-K-T, Quach N-D-P, Pudhom K, Hansen PE, et al. Chemical constituents from *Sonneratia ovata* Backer and their in vitro cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015 Jun;25(11):2366–71.
4. Bonner. Prosiding SEMIRATA 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat Universitas Tanjungpura, Pontianak Hal. 29 - 37. 2007;(1c):29–37.
5. Nurmallasari F, Ersam T, Fatmawati S. Isolasi Senyawa Antioksidan Dari Kulit Batang *Sonneratia Ovata* Backer. *J Sains dan Seni ITS*. 2016;5(2).
6. Nurdia. Isolasi Dan Identifikasi Antioksidan Terhadap Daun Pedada (*Sonneratia Caseolaris* L.). *BMC Public Health*. 2017;5(1).
7. Putri FI, Ersam T, Fatmawati S. Isolasi Senyawa 3β-asetoksi-lup-20(29)-en-2α-ol dan Uji Antioksidan dari Tumbuhan Kepulauan Aru (*Sonneratia ovata* Backer). *J Sains Dan Seni Its*. 2016;5(2).
8. Zhang Q, Zhang J, Shen J, Silva A, Dennis D, Barrow C. A Simple 96-Well Microplate Method for Estimation of Total Polyphenol Content in Seaweeds. *J Appl Phycol*. 2006 Nov 27;18.
9. Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. *J Agric Food Chem*. 2004 Aug;52(16):5032–9.
10. Molyneux P. The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 2003 Nov 30;26.
11. Papatungan Z, Wonggo D, Kaseger BE. Uji Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Buah Mangrove *Sonneratia Alba* Di Desa Nunuk Kecamatan Pinolosian Kabupaten Bolaang Mongondow Selatan Sulawesi Utara. *MEDIA Teknol Has Perikan*. 2017;5(3).
12. Nguyen THT, Kim Tuyen Pham N, Pudhom K, Hansen PE, Nguyen KPP. Structure elucidation of four new megastigmanes from *Sonneratia ovata* Backer. *Magn Reson Chem*. 2014 Dec;52(12):795–802.
13. Hery W. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas: Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan. *J Gadjah Mada Univ Press Yogyakarta*. 2007;(Yogyakarta).

14. Azizah DN, Kumolowati E, Faramayuda F. Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika J Ilm Farm.* 2014;2(2).
15. Stratil P, Kubáň V, Fojtová J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. *Czech J Food Sci.* 2008;26(4).
16. Tursiman, Ardiningsih P, Nofiani R. Total Fenol Fraksi Etil Asetat dari Buah Asam Kandis (*Garcinia dioica* Blume). *Jkk.* 2012;1(1).
17. Xu BJ, Chang SKC. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci.* 2007;72(2).
18. Mustarichie R, Runadi D, Ramdhani D. The antioxidant activity and phytochemical screening of ethanol extract, fractions of water, ethyl acetate, and n-hexane from mistletoe tea (*Scurrula atropurpurea* BL. dans). *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(2).
19. Yuhernita, Juniarti. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Metanol Daun Surian yang Berpotensi sebagai Antioksidan. *Fak Kedokt Univ Yars Jakarta.* 2011;15(1).
20. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *J Agric Food Chem.* 2002 Jan;50(3):468-72..