

## **Uji Aktivitas Antioksidan Daun Paku Resam (*Gleichenia linearis*(Burm.f.) S. W. Clarke)dengan Metoda DPPH**

### **Antioxidant Activity Test of *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarkeleaves with DPPH Method**

Rosiana Rizal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi FarmasiUniversitas Dharma Andalas

*rosianarizal03@gmail.com*

#### **Abstrak**

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol dan fraksinasi daun paku resamdengan metoda DPPHdan menentukan nilai IC<sub>50</sub> menggunakan persamaan regresi linear telah dilakukan terhadap senyawa fenolat, flavonoid dan saponin dari daun paku resam.Kurva kalibrasi asam galat 765 nm  $y=0,3977+0,004395x$ . SerapanDPPH 35 µg/mL menggunakan spektrofotometer UV-Vis diperoleh 0,504 dengan panjang gelombang 517,5 nm. Pengujian aktifitas antioksidan ekstrak etanol daun paku resam dengan metoda pengukuran serapan DPPH 35 µg/mL konsentrasi 10; 15; 20; 25; 30 µg/mL daya hambat 34,12; 38,69; 50,59; 58,33; 74,40 %, sedangkan fraksi etil asetat diperoleh daya hambat 33,33; 46,42; 53,76; 55,95; 58,92 %. Dibandingkan dengan asam galat konsentrasi 2; 3; 4; 5; 6 µg/mL daya hambat 38,09; 51,38; 60,71; 66,67; 71,82 %. Fraksi butanol konsentrasi 1; 10; 15; 20; 25; 30 µg/ml daya hambat 40,67; 63,29; 71,62; 79,36; 86,50; 93,65 %. Hasil perhitungan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol adalah 17,286 µg/mL, fraksi etil asetat adalah 22,232 µg/mL, dan fraksi butanol adalah 4,15 µg/mL. Dari penelitian didapatkan hasil antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dari paku resam yaitulebih kecil dari pada antioksidan asam galat yaitu 17,286 µg/mL dan 22,232 µg/mL, serta fraksi butanol hampir mendekati daya antioksidan asam galat yaitu 4,15 µg/mL, sedangkan asam galat 3,407 µg/mL.

**Kata kunci:** *antioksidan, daun paku resam, DPPH*

#### **Abstract**

*Antioxidant activity test of ethanol extract and fractionation of *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarke leaves by DPPH method and determining the IC<sub>50</sub> value by using linear regression equation had been conducted on phenolic, flavonoid and saponin compounds from *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarke leaves. Calibration curve of gallic acid was 765 nm  $Y=0.3977 + 0.004395x$ . DPPH uptake of 35 µg/mL using UV-Vis spectrophotometer was obtained 0.504 with a wavelength of 517.5 nm. Antioxidant activity test of ethanol extract of *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarke leaves by 35 µg/mL DPPH uptake*

**Research Article**

*measurement method of 10; 15; 20; 25; 30 µg/mL concentration, the inhibitory power were 34.12; 38.69; 50.59; 58.33; 74.40%, while the ethyl acetate fraction were obtained inhibitory power of 33.33; 46.42; 53.76; 55.95; 58.92%. Compared to gallic acid of 2; 3; 4; 5; 6 µg/mL concentration, the inhibitory power were 38.09; 51.38; 60.71; 66.67; 71.82%. Butanol fraction of 1; 10; 15; 20; 25; 30 µg/mlconcentration, the inhibitory power were 40.67; 63.29; 71.62; 79.36; 86.50; 93.65%. IC<sub>50</sub>measurement result for ethanol extract was 17.286 µg/mL, ethyl acetate fraction was 22.232 µg/mL, and butanol fraction was 4.15 µg/mL. The research showed the antioxidant result of ethanol extract and ethyl acetate fraction of *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarke leaves was smaller than the antioxidant of gallic acid of 17.286 µg/mL and 22.232 µg/mL, as well as butanol fraction that was almost close to the antioxidant of gallic acid of 4.15 µg/mL, while gallic acid was 3.407 µg/mL.*

**Keyword:** antioxidant, *Gleichenia linearis* (Burm.f) S.W. Clarke leaves, DPPH

## **PENDAHULUAN**

Banyaknya tumbuhan-tumbuhan yang mengandung antioksidan memberikan peluang bagi para peneliti untuk mengetahui lebih lanjut tentang arti dan penggunaan sebenarnya dari antioksidan. antioksidan sangat bermanfaat bagi kesehatan dalam pencegahan proses menua dan penyakit degeneratif (Shihabiet *all*, 2002).

Radikal bebas bersifat tidak stabil dan selalu berusaha mengambil elektron dari molekul di sekitarnya, sehingga radikal bebas bersifat toksik terhadap molekul biologi/sel. Radikal bebas dapat mengganggu produksi DNA, lapisan lipid pada dinding sel, mempengaruhi pembuluh darah, produksi prostaglandin, dan protein lain seperti enzim yang terdapat dalam tubuh (Droge, 2002).

Paku Resam (*Gleichenia linearis* (Burm.f.) S. W. Clarke) mengandung senyawa antioksidan seperti flavonoid yaitu kaempferol dan fenol (Adfa, 2005). Dari pemeriksaan pendahuluan terhadap paku resam yang tumbuh disekitar Kampus Universitas Andalas, Limau Manis, Padang, diketahui paku tersebut memberikan reaksi positif terhadap pereaksi flavonoid. Dan ditemukannya senyawa kaempferol 3-O-glukopiranosil 7-O-NaSO<sub>4</sub> dari fraksi etil asetat daun paku resam yang mempunyai aktifitas sebagai antiinflamasi (Jubahar, 2000).

Peneliti melakukan pengujian lebih lanjut keberadaan antioksidan pada ekstrak etanol, etil asetat, dan butanol. Untuk memperdalam pengetahuan tentang tanaman ini beserta peranannya dalam ilmu pengobatan, dilakukan penelitian secara khusus terhadap tanaman semak menahun ini, terutama tentang aktivitas antioksidan yang dimilikinya.

## **METODOLOGI**

### **Alat dan Bahan**

Alat dan bahan yang digunakan adalah: Kertas saring whatman no.1, Rotary evaporator, timbangan digital, labu ukur, plat tetes, pipet takar, pipet mikro, spatel, aluminium foil, erlemeyer, vial, gelas ukur, corong pisah, tabung reaksi, magnetic stirrer, seperangkat alat spektrofotometer UV-Visibel, daun paku resam (*Gleichenia linearis* (Burm.f.) S. W. Clarke) segar, aquadest, etanol 96%,

**Research Article**

methanol, Asam galat p.a (Merck), 2,2-difenil 1-pikrilhidrazil (DPPH) p.a (Merck), heksan, etil asetat, butanol.

**Pembuatan Reagen**

1. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat (500 µg/ml) 0,025 gram asam galat, dimasukkan ke dalam labu ukur 50 ml, tambahkan 5 ml etanol 96% lalu tambahkan aquadest sampai tanda batas.
2. Pembuatan Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M 5 gram Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tambahkan 20 ml aquadest.
3. Larutan DPPH(2,2 difenil-1-pikrilhidrazil) 35 µg/ml 10 mg DPPH larutkan dengan methanol dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas, sehingga diperoleh konsentrasi 100 µg/ml, lakukan pengenceran pipet 17,5 ml dari larutan, masukkan ke dalam labu ukur 50 ml, tambahkan methanol hingga tanda batas, diperoleh konsentrasi 35 µg/ml.

**Penyiapan Sampel**

Daun paku resam segar dibersihkan dari tangkai nya, dirajang sampai derajat kehalusan tertentu ± 1 cm, ditimbang 200 gram, dicuci dengan aquadest, maserasi dengan etanol 96 % selama 1 jam, aduk dengan magnetic stirrer 15 menit, saring dengan kertas saring whatman no.1 (filtrat 1). Ampas diekstraksi lagi ulangi hingga didapatkan filtrat ketiga, Ketiga filtrat digabungkan, pelarutnya diuapkan dengan rotary evaporator diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental diperoleh sebanyak 27 gram, tambah dengan campuran methanol : air (1:1) dalam labu ukur 100 ml, didapatkan konsentrasi larutan ekstrak sampel 2000 mg/ml, ukur aktivitas antioksidannya menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang maksimum. Fraksinasi dengan n-heksan sebanyak (3x50 ml), kocok di dalam corong pisah didapatkan dua fraksi, yaitu fraksi heksan dan fraksi air.

Fraksi air tambahkan etil asetat sebanyak (3x50 ml), kocok dalam corong pisah didapatkan dua fraksi, yaitu fraksi air dan fraksi etil asetat. Ketiga filtrat etil asetat digabung, diuapkan dengan rotary evaporator, diperoleh fraksi kental etil asetat 15 gram. Selanjutnya, fraksi kental etil asetat diencerkan dengan methanol : air (1:1) dalam labu ukur 50 ml, diperoleh fraksi encer dari etil asetat.

Pada fraksi air tambahkan butanol sebanyak (3x50 ml), kocok dalam corong pisah didapatkan dua fraksi, yaitu fraksi air dan fraksi butanol. Ketiga filtrat butanol tersebut digabung, diuapkan dengan rotary evaporator, diperoleh fraksi kental butanol 0,25 gram. Fraksi kental butanol diencerkan dengan methanol : air (1:1) dalam labu ukur 50 ml, diperoleh fraksi encer dari butanol. Masing-masing fraksi encer tadi diukur aktivitas antioksidannya dengan spektrofotometer UV-VIS.

### **Pemeriksaan Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Paku Resam (Harborne, 1987)**

0,5 gram ekstrak tambahkan kloroform : air suling (1:1) 5 ml masing-masingnya kocok dalam tabung reaksi biarkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan.

#### **1. Pemeriksaan Flavonoid**

Ambil 1-2 tetes lapisan air, tambahkan logam Mg dan 1-2 tetes HCl p. Timbulnya warna orange kemerahan menunjukkan adanya flavonoid.

#### **2. Pemeriksaan Saponin**

Lapisan air dikocok kuat dalam tabung reaksi hingga terbentuk busa yang tidak hilang selama 15 menit.

#### **3. Pemeriksaan Fenolat**

Lapisan air 1-2 tetes tambahkan 1-2 tetes  $\text{FeCl}_3$ . terbentuk warna biru menunjukkan adanya senyawa fenolat.

#### **4. Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid**

Lapisan kloroform 1-2 tetes masukkan dalam plat tetes, biarkan kering. Tambahkan pereaksi Liberman-Buchard. Warna merah menunjukkan adanya senyawa terpenoid dan warna biru menunjukkan adanya senyawa steroid.

#### **5. Pemeriksaan Alkaloid**

Masukkan 2-3 tetes lapisan kloroform dalam tabung reaksi tambahkan dengan 1 tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N, kocok dan biarkan memisah. Ambil lapisan asam, tambahkan Mayer, terbentuknya kabut putih menunjukkan adanya alkaloid.

### **Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat**

#### **1. Panjang Gelombang Serapan Maksimum Asam Galat**

Buat larutan standar asam galat konsentrasi 50  $\mu\text{g/ml}$ ; pipet 5 ml larutan induk asam galat (500  $\mu\text{g/ml}$ ) encerkan dengan campuran methanol : aquadest (1:1) dalam labu ukur 50 ml sampai tanda batas. Larutan standar 50  $\mu\text{g/ml}$  dipipet 0,5 ml lalu dicampur dengan 5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu yang sudah diencerkan dengan 1:10 dengan aquadest, tambahkan 4 ml larutan  $\text{NaCO}_3$

**Research Article**

M biarkan selama 15 menit. Ukur serapan pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer uv-visibel.

**2. Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat**

Larutan induk asam galat dipipet 1; 2; 3; 4; 5; ml, encerkan dengan campuran methanol : aquadest (1:1) dalam labu ukur 25 ml sampai tanda batas, diperoleh konsentrasi 20; 40; 60; 80; 100; µg/ml asam galat. Dari masing-masing konsentrasi larutan dipipet 0,5 ml kemudian dicampur dengan 5 ml pereaksi Folin-Ciocalteu yang sudah diencerkan 1:10 dengan aquadest, tambahkan 4 ml NaCO<sub>3</sub> 1 M. biarkan selama 15 menit, ukur serapan dengan spektrofotometer uv-vis pada panjang gelombang 765 nm.

**Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metoda DPPH (Okawa, 2001)**

**1. Penentuan Panjang Gelombang Serapan Maksimum DPPH 50 µM**

Pipet 4 ml larutan DPPH 35 µM tambahkan 2 ml methanol, biarkan selama 30 menit ditempat gelap serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang maksimum.

**2. Penentuan Aktivitas Antioksidan Standart Asam Galat**

Pipet 1 ml larutan induk asam galat (5 mg/ml) larutkan dengan campuran etanol 96% dan aquadest (1:1) dalam labu ukur 100 ml sampai tanda batas, didapat konsentrasi 50 µg/ml, dari larutan ini masing-masing dipipet 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,2 ml masukkan kedalam labu ukur 10 ml tambahkan campuran etanol 96% dan aquadest (1:1) sampai tanda batas diperoleh konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 µg/ml.

Pipet 2 ml masing-masingnya masukkan kedalam vial, tambahkan 4 ml larutan DPPH 35 µg/ml, diamkan selama 30 menit ditempat gelap. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 517,5 nm. Hitung % inhibisi masing-masingnya lalu buat kurva kalibrasi antara konsentrasi larutan pembanding asam galat dan % inhibisi sehingga diperoleh persamaan regresi liniernya. IC<sub>50</sub> asam galat adalah konsentrasi larutan pembanding asam galat yang memberikan inhibisi sebesar 50%, yang dapat dihitung menggunakan persamaan regresi linier yang diperoleh.

**3. Penentuan Aktivitas Antioksidan Sampel**

**Research Article**

1. Larutan Ekstrak Etanol

konsentrasi sampel 2000 mg/ml diencerkan dengan metanol diperoleh konsentrasi (10, 15, 20, 25, 30 µg/ml), pipet masing-masing 0,5 ml masukkan ke dalam vial, tambahkan 4 ml larutan DPPH 35 µM, homogenkan, diamkan 30 menit ditempat gelap. Serapan larutan ukur dengan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang 517,5 nm.

**Pengolahan Data**

a) Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

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

Ket :

A kontrol: serapan radikal DPPH 35 µM pada panjang gelombang 517,5 nm.

A sampel: serapan sampel dalam radikal DPPH 35 µM pada panjang gelombang 517,5 nm dikurangi serapan sampel tanpa DPPH.

b) Nilai IC<sub>50</sub> :

Masing-masing konsentrasi sampel dihitung nilai IC<sub>50</sub> dengan menggunakan persamaan regresi linear.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Daun paku resam (*Gleichenia linearis* (Burm.f.) S. W. Clarke) diambil di sekitar kampus Universitas Andalas, kemudian sampel di rajang terlebih dahulu, tujuan perajangan untuk memperluas permukaan sampel sehingga permukaan kontak dengan pelarut semakin luas dan akan memudahkan penetrasi pelarut ke dalam sel. Lakukan maserasi sebab cara ini lebih mudah, tidak memerlukan alat-alat khusus, dan memungkinkan terjadinya penguraian zat aktif oleh pengaruh suhu dapat dihindari. Hasil maserasi di saring sehingga diperoleh maserat. Pelarut yang digunakan etanol 96%, dipertimbangan sebagai cairan penyari karena lebih selektif, dan bakteri sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, tidak beracun, netral, absorpsi, etanol dapat bercampur dengan air pada segala perbandingan, dan memperbaiki stabilitas obat (Voigt, 1994).

Semua filtrat hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator diperoleh ekstrak kental etanol 30 g dari 200 g daun paku resam. Pemeriksaan larutan standar asam galat didapat kurva

**Research Article**

kalibrasi  $y = 0,3977 + 0,004395x$  dengan panjang gelombang 765 nm dan koefisien korelasinya ( $r$ ) 0,989195211, hasil yang diperoleh cukup linier karena mendekati 1.

Untuk metoda pengujian aktifitas antioksidan menggunakan metoda DPPH karena merupakan metoda yang sederhana, mudah, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel dengan waktu yang relatif singkat (Hanani *et al*, 2005). Senyawa yang mempunyai aktifitas antioksidan akan bereaksi dengan DPPH atau terjadi perubahan warna dari ungu violet menjadi kuning diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Molyneux, 1996). Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum DPPH adalah 517,5 nm dan absorban 0,504. Ketika elektron ganjil dari radikal DPPH telah berpasangan dengan hidrogen dari senyawa penangkap radikal bebas maka akan membentuk DPPH-H tereduksi (Molyneux, 2004).

Oleh karena terjadinya reaksi fenol dan DPPH, maka radikal bebas DPPH akan membentuk senyawa bukan radikal yaitu DPPH idrazin yang stabil (Windono *et al*, 2001)

IC<sub>50</sub> menentukan konsentrasi senyawa antioksidan yang memberikan inhibisi sebesar 50%, artinya konsentrasi tersebut antioksidan dapat menghambat radikal bebas sebesar 50%. Flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat yang merupakan pendonor hidrogen yang sangat baik (Prakash dan Gupta, 2009).

Pembandingan digunakan larutan asam galat konsentrasi 2, 3, 4, 5, 6 µg/mL. Setelah absorban diperoleh dihitung persen inhibisi DPPH diperoleh persamaan regresi  $y = 21,262 + 8,433x$ , koefisien korelasinya ( $r$ ) 0,999, nilai IC<sub>50</sub> asam galat yaitu 3,407 µg/mL. Besarnya aktifitas antioksidan larutan sampel ekstrak etanol konsentrasi 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL diperoleh persamaan regresi ekstrak etanol paku resam yaitu  $y = 15,15 + 2,016x$ , ekstrak etil asetat konsentrasi 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL diperoleh persamaan regresi fraksi etil asetat paku resam yaitu  $y = 22,294 + 1,2462x$ , ekstrak butanol konsentrasi 1, 10, 15, 20, 25, 30 µg/mL diperoleh persamaan regresi fraksi butanol yaitu  $y = 42,60 + 1,77x$ . Daya antioksidan paku resam cukup rendah dari asam galat karena nilai IC<sub>50</sub> lebih besar dari asam galat. Tidak adanya korelasi yang signifikan antara kadar fenolik dengan aktivitas antioksidan juga ditemukan pada tanaman obat, misalnya pada *sea buckthorn* yang kaya akan karotenoid, namun pada tanaman berserat seperti *flaxseed* ditemui korelasi yang signifikan (Velioglu, 1998).

**KESIMPULAN**

Dari penelitian yang telah dilakukan antioksidan ekstrak etanol dan fraksi etil asetat dari paku resam lebih kecil dari pada antioksidan asam galat yaitu 17,286 µg/mL dan 22,232 µg/mL,



**Research Article**

antioksidan ekstrak paku resam dari fraksi butanol hampir mendekati daya antioksidan asam galat yaitu 4,15 µg/mL, sedangkan asam galat 3,407 µg/mL.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Adfa, M., 2005, Survey Ebotani, Studi Senyawa Flavonoid dan Uji Brine Shrimp Beberapa Tumbuhan Obat Tradisional Suku Serawai di Propinsi Bengkulu, <http://gradienfmipaunib.Files.wordpress.com/2008/07/monna-adfa.pdf>., was accessed on 30 juni 2010.
- Droge. W., 2002, Free Radicals in the Physiological Control of cell Function. *Physiol Rev*; 82:47-95.
- Hanani, E., A. Mun'im., R. Sekarini., 2005, Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons *Callyspongia* SP Dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian*; 2(3):127-133.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB Press, Bandung. Halaman 5; 234.
- Jubahar, J., 2000, Isolasi Flavonoid dari Paku Resam *Gleichenia linearis* (Burm) Clarke, Tesis, FMIPA Universitas Andalas, Padang.
- Molyneux, P., 2004, The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *J. Sci. Technol*; 26(2): 211-219.
- Narins, D.M.C. 1996. Vitamin Dalam Krause's Food, Nutrition and Diet Therapy. Mahlan, L.K, hal 110-114.
- Okawa, M., J. Kinjo, T. Nohara., M. Ono., 2001, Modification Method DPPH (2,2-difenil-1-pikrylhydrazil) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biol. Pharm. Bull*; 10(24): 1202.
- Prakash, D., Gupta, K.R., 2009 The Antioxidant Phytochemicals of Nutraceutical Importance. *The Open Nutraceuticals Journal*; 2: 20-35.
- Shihabi, A., Li, W.G., Miller, Jr. F.G., Weintraub, N.L., 2002, Antioxidant therapy for atherosclerotic vascular disease: the promise and the pitfalls. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 282 (3): 797-802.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. dan Oomah, B.D., 1998, Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, dan Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 4113-4117.
- Voigt, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. UGM Press, Yogyakarta. Halaman 141-142.

**Research Article**

Windono, T., Soediman, S., Yudawati, U., Ermawati, E., Srielita, Erowati, T. I., 2001, Uji Peredam Radikal Bebas terhadap 1,1-Diphenyl-2- Picrylhydrazyl (DPPH) dari Ekstrak Kulit Buah dan Biji Anggur (*Vitis vinifera* L.) Probolinggo Biru dan Bali. *Artocarpus*; 1: 34-