

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ANTIOXIDANT COMPOUNDS IN FERN STEMS (*ALSOPHILA GLAUCA* J.SM) USING DPPH METHOD (2,2-DIPHENYL-1-PICRYLHYDRAZYL)

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DARI BATANG PAKIS (*ALSOPHILA GLAUCA* J.SM) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1 PIKRILHIDRAZIL)

Sri Wahdaningsih^{1,2*} Subagus Wahyuono² Erna Prawita Setyowati²

¹Department of Pharmacy, Faculty of Medicine Public Health Sciences, Universitas Tanjungpura Pontianak, 78124

²Department of Biology, Faculty of Pharmacy Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, 55281

ABSTRACT

*Oxidative stress induced by the radicals have been known to affect the occurrence of various degenerative disease. In order to search natural antioxidant compounds, it had been studied the isolation and identification of antioxidant compounds in fern stems (*Alsophila glauca* J.Sm) using DPPH method (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Fern stem extraction was done by maceration with wasbenzen and metanol. Extracts was obtained by evaporating the wasbenzen solvent with a rotavapor. Material was re-macerated with methanol after wasbenzen evaporation. The same way was done to obtain the metanol extract. These extracts were tested for antioxidant activity using DPPH method with TLC. Active extract was partitioned in 80% methanol. Both 80% methanol soluble and insoluble extract were tested their antioxidant activity using DPPH method (TLC). Active extract was fractionated in vacuum liquid chromatography using a mobile phase with different polarity gradient and different concentrations (wasbenzen:chloroform). Active fraction was isolated by preparative TLC method and purity of obtained compounds was tested by TLC. Antioxidant activity of obtained isolates was tested by DPPH method using spectrophotometry. Compounds known to had antioxidant activity as radical catcher with IC_{50} 178.4 μ g/mL.*

Key words : Stem fern, antioxidant, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

ABSTRAK

*Stress oksidatif yang diinduksi oleh radikal bebas diketahui dapat mempengaruhi terjadinya berbagai penyakit degeneratif. Sebagai upaya dalam pencarian senyawa antioksidan alami maka telah dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi senyawa antioksidan dari batang pakis (*Alsophila glauca* J.Sm) dengan metode DPPH. Penyarian batang pakis dilakukan secara maserasi dengan wasbenzen dan metanol. Ekstrak didapat dengan menguapkan pelarut wasbenzen dengan rotavapor. Setelah semua wasbenzen menguap bahan dimaserasi lagi dengan metanol. Dengan cara yang sama seperti pada wasbenzen hingga didapat ekstrak metanol. Ekstrak ini diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara KLT. Ekstrak yang aktif kemudian dipartisi dengan metanol 80%. Ekstrak yang larut dan ekstrak yang tidak larut dalam metanol 80% diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH (KLT). Ekstrak yang aktif difraksinasi dengan kromatografi cair vakum dengan menggunakan fase gerak dengan gradient kepolaran yang berbeda (wasbenzen : kloroform) dengan berbagai konsentrasi. Fraksi yang aktif diisolasi dengan metode KLT preparatif dan diperoleh senyawa yang kemurniannya diuji secara KLT. Isolat yang diperoleh diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH menggunakan alat spektrofotometri. Diketahui mempunyai aktivitas antioksidan penangkap radikal dengan IC_{50} 178,4 μ g/mL.*

Kata kunci : Batang pakis, antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan suatu molekul yang memiliki elektron tidak berpasangan dalam orbital terluarnya sehingga sangat reaktif. Radikal ini cenderung mengadakan reaksi berantai yang apabila terjadi di dalam tubuh akan dapat menimbulkan kerusakan-kerusakan yang berlanjut dan terus-menerus.

Antioksidan juga digunakan dalam makanan untuk mengontrol oksidasi lipid. Senyawa *t*-butil hidroksi anisol (BHA) dan di-*t*-butil hidroksitoluen (BHT) digunakan sebagai antioksidan pangan, tetapi kemungkinan adanya efek samping yang merugikan maka tidak digunakan untuk bahan terapi (Rohdiana, 2001).

Antioksidan sintetik memiliki efek berbahaya jika dikonsumsi manusia karena dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis pada manusia (Amarowich *et al.*, 2000) dan kerusakan hati. Antioksidan alami lebih disarankan untuk dikonsumsi oleh karena itu banyak penelitian dilakukan untuk mencari bahan-bahan alami yang dapat digunakan sebagai antioksidan (Rohman, dan Riyanto, 2005). Antioksidan berfungsi sebagai pereduksi, penangkapan radikal bebas dan pemadam pembentukan oksigen singlet (Sofnie *et al.*, 2003).

Untuk menentukan apakah suatu senyawa memiliki aktivitas sebagai antioksidan dapat digunakan beberapa metode pengujian, salah satunya dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Senyawa DPPH adalah radikal yang distabilkan oleh delokalisasi elektron bebas secara menyeluruh dan menyebabkan DPPH tidak mudah membentuk dimer. Pencampuran radikal DPPH dengan substansi yang mampu menyumbangkan sebuah atom hidrogen akan memunculkan bentuk tereduksi yang ditunjukkan oleh perubahan warna ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini dapat diukur secara spektrofotometri (Molyneux, 2004). Metode ini banyak dipilih karena mempunyai tingkat akurasi yang tinggi dan relatif lebih mudah dikerjakan.

Indonesia memiliki keanekaragaman jenis tumbuhan, sehingga mempunyai potensi luar biasa untuk penemuan sumber-sumber antioksidan alami baru. Kandungan kimia yang dilaporkan dalam tumbuhan pakis adalah senyawa saponin, tanin, fenol dan terpenoid (Utami, 2009). Senyawa yang mempunyai aktivitas antioksidan dari tumbuhan pakis belum pernah dilaporkan.

Bertitik tolak dari hal tersebut, maka dilakukan penelitian isolasi dan identifikasi serta uji aktivitas antioksidan senyawa aktif dari batang pakis.

METODOLOGI

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Batang pakis yang digunakan berasal dari tumbuhan pakis (*Alsophila glauca* J.Sm.), *Wasbenzen* (tehnis), *wasbenzen* (p.a), kloroform (p.a), metanol (teknis), aquadest, n-hexan (p.a), etil asetat (p.a) (E. Merck), silika gel 60 PF₂₅₄, plat KLT (E. Merck), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma, Chem.Co), pereaksi serium sulfat.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana maserasi tertutup (stoples), corong buchner, pengaduk, rotary evaporator, labu erlenmayer, lampu ultraviolet panjang gelombang 336nm dan 254nm, plat kaca, corong pisah, kolom gelas untuk kromatografi cair vakum (sinterglass), pipet tetes, pipa kapiler, Spektrofotometer ultra violet-tampak, spektrofotometer infra merah dengan model : SHIMADZU FTIR 8201 PC, spektrometer massa (GC-MS) dengan model : GC-MS SHIMADZU QP-5000.

Isolasi senyawa aktif

Ekstraksi

Serbuk kering (600 gram) disari dengan cara tiga kali maserasi selama 24 jam pada suhu kamar masing-masing 2000, 1750, 1500mL menggunakan pelarut *wasbenzen*. Penyaringan dilakukan dengan corong Buchner dan ampas dimaserasi dua kali lagi dengan cara yang sama kemudian disaring. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak. Ampas diangin-anginkan sampai terbebas dari bau *wasbenzen*. Kemudian dengan cara yang sama seperti pada penyarian dengan *wasbenzen*, ampas tersebut disari menggunakan metanol. Filtrat digabung dan diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak metanol.

Partisi

Ekstrak aktif dilarutkan dalam pelarut metanol 80% kemudian divortex beberapa menit sehingga terbentuk endapan (tidak larut metanol 80%) dan filtrat (larut metanol 80%). Kemudian diuapkan sampai diperoleh ekstrak yang tidak larut metanol 80% dan ekstrak yang larut metanol 80%.

Uji pendahuluan antioksidan penangkap radikal

Uji pendahuluan sebagai antioksidan penangkap radikal dilakukan sesuai metode Demirezer dkk (2001). Kromatogram dikeringkan dan disemprot dengan larutan 0,2% DPPH dalam metanol. Kromatogram diperiksa 30 menit setelah

*) Correspondence : Sri Wahdaningsih
E-mail : imsukadana@yahoo.com

penyemprotan. Senyawa aktif penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna putih kekuningan dengan latar belakang ungu.

Kromatografi

Kromatografi lapis tipis: Sebelum dilakukan kromatografi cair vakum, dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT) pendahuluan terhadap ekstrak aktif dengan menggunakan berbagai variasi pengembang agar didapat eluen yang sesuai pada kromatografi kolom.

Kromatografi cair vakum: Langkah kerja kromatografi cair vakum adalah sebagai berikut: sebanyak 2g ekstrak diencerkan dengan pelarut yang cocok dalam cawan porselin, kemudian dikeringkan dengan silica gel PF₂₅₄ sampai menjadi serbuk kering. Sinterglas diisi dengan serbuk fase diam silica gel PF₂₅₄ sampai mencapai ketinggian ± ½ dari tinggi sinterglas, kemudian serbuk sampel diletakkan di atasnya. Serbuk sampel kemudian ditutupi dengan kertas saring. Dilakukan elusi secara vakum dengan fase gerak yang polaritasnya meningkat.

Masing-masing fraksi dilakukan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan sistem pengembang yang sama dan bercak yang menunjukkan kesamaan digabung. Masing-masing fraksi gabungan diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

KLT preparative: Senyawa aktif yang terdapat dalam fraksi diisolasi dengan menggunakan KLT preparatif dengan fase diam silika gel PF₂₅₄, tebal 0,5mm. Plat yang telah ditotol dimasukkan ke dalam bejana yang berisi larutan pengembang. Setelah pengembangan selesai, plat dikeluarkan dan dibiarkan hingga fase geraknya menguap. Untuk mengetahui bercak pita yang akan dikerok, plat diamati di bawah lampu UV₂₅₄ dan langsung ditandai bagian-bagian yang akan dikerok. Serbuk hasil kerokan dilarutkan dalam pelarut kloroform, diaduk dengan pengaduk magnetik (*stirrer*), kemudian disaring dengan penyaringan vakum. Hasil penyaringan ini diuapkan dan diperoleh isolat (filtrat) yang kering.

Pemeriksaan kemurniaan dengan KLT

Filtrat yang kering dilarutkan lagi dalam pelarut campuran metanol-kloroform (1:1 v/v) lalu ditotolkan pada lempeng silika gel F₂₅₄ dan dikembangkan dalam pengembang yang sesuai dengan sistem KLT preparatif.

Uji aktivitas antioksidan

Senyawa-senyawa yang telah terpisah melalui isolasi secara KLT preparatif diuji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode Kwon dan Kim (Kwon dan Kim, 2003). Larutan isolat

dalam kloroform pada beberapa konsentrasi (1-32µg/mL) sebanyak 1,2mL ditambah 0,3mL larutan DPPH 0,4mM dalam kloroform sehingga volume total campuran 1,5mL dan campuran dikocok kuat. Setelah didiamkan pada temperatur kamar selama 30 menit, sisa DPPH ditentukan secara spektrofotometri pada panjang gelombang 517nm. Pengujian ini juga dilakukan pengukuran terhadap blangko (larutan DPPH yang tidak mengandung bahan uji) serta kontrol positif kuersetin. Aktivitas penangkap radikal DPPH(%) dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Aktivitas} = \frac{(A \text{ blangko} - A \text{ sampel})}{A \text{ blangko}} \times 100 \%$$

Data aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH hasil isolat dan kuersetin dianalisis dan masing-masing dihitung nilai IC₅₀ melalui analisis probit. IC₅₀ adalah konsentrasi yang mampu menghambat 50% DPPH.

Identifikasi senyawa aktif

Identifikasi senyawa aktif dilakukan dengan menganalisis data spektrum ultraviolet-visibel, spektrum infra merah, spektrum massa.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini sistem penyarian menggunakan metode maserasi. Sebagai pelarut dalam ekstraksi digunakan *wasbenzen* dan metanol. Maksud penggunaan pelarut dengan kepolaran yang berbeda-beda ini adalah untuk mengekstraksi senyawa konstituen dari batang pakis secara lengkap, baik dari non polar maupun yang polar. Digunakan metode maserasi karena maserasi termasuk penyarian dingin sehingga kandungan zat aktif relatif aman dari kerusakan oleh panas. Hasil ekstraksi serbuk kering batang pakis dengan menggunakan 2 jenis pelarut seperti pada tabel I berikut.

Tabel I. Hasil ekstraksi serbuk batang *Alsophila glauca* J.Sm

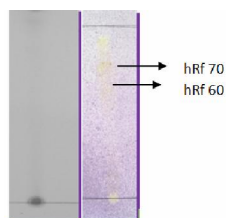
Pelarut Penyari	Berat Ekstrak (gram)	Rendemen (%)	Warna Ekstrak
<i>Wasbenzen</i>	5,55	0,93	Hitam
Metanol	2,55	0,43	Hitam

Partisi ekstrak aktif (ekstrak *wasbenzen*) dilakukan dengan menggunakan pelarut metanol 80%. Campuran tersebut diaduk perlahan – lahan agar tidak terbentuk emulsi. Digunakan metanol 80% karena agar senyawa – senyawa polar yang masih ada pada ekstrak *wasbenzen* dapat larut.

Hasil uji pendahuluan antioksidan penangkap radikal

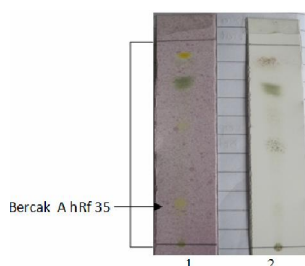
Bercak pada kromatogram hasil pengembangan dengan *wasbenzen* dan kloroform (1:9v/v) diuji aktivitasnya sebagai antioksidan penangkap radikal dengan disemprot larutan DPPH 0,2%. Hasil yang diperoleh tercantum pada gambar 1 dan 2. Adanya aktivitas penangkap radikal ditunjukkan oleh peredaman warna DPPH yaitu terjadi warna kekuningan dengan latar belakang ungu.

Gambar 1 menunjukkan perbedaan aktivitas antioksidan pada ekstrak metanol dan ekstrak *wasbenzen*. Ekstrak metanol tidak menunjukkan aktivitas antioksidan setelah disemprot larutan DPPH 0,2%. Sedangkan ekstrak *wasbenzen* menunjukkan adanya aktivitas antioksidan yang ditandai dengan timbulnya bercak kekuningan dengan latar belakang ungu pada hRf 60 dan 70. Hasil pemisahan partisi dengan metanol 80% yang diperoleh dari ekstrak *wasbenzen* (tidak larut metanol) di kromatografi lapis tipis (KLT) kemudian di elusi dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1:9v/v). hasil kromatogram dapat dilihat pada gambar 2.



Gambar 1. Bercak pada kromatogram ekstrak *wasbenzen* dan ekstrak metanol hasil pengembangan dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1: 9v/v) , fase diam silika gel F₂₅₄ yang disemprot DPPH

Keterangan : 1.Ekstrak metanol (negatif antioksidan)
2.Ekstrak *wasbenzen* (positif antioksidan)



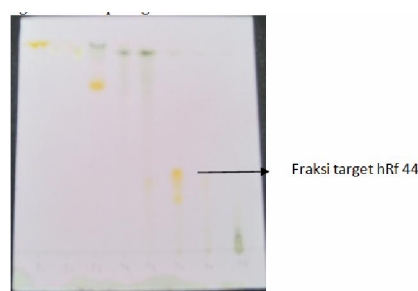
Gambar 2. Bercak pada kromatogram hasil partisi ekstrak *wasbenzen* (tidak larut metanol) hasil pengembangan dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1: 9v/v), fase diam silika gel F₂₅₄.

Keterangan: 1.Disemprot DPPH
2.Disemprot serum sulfat

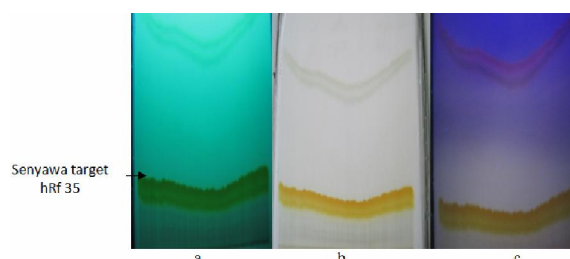
Fraksinasi ekstrak *wasbenzen* (tidak larut metanol)

Dari hasil fraksinasi diperoleh 8 fraksi. Fraksi – fraksi yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara KLT. ogram terlihat pada gambar 3.

Hasil uji yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi 6 menunjukkan aktivitas antioksidan yang paling baik dengan harga hRf 44. Fraksi yang aktif tersebut selanjutnya dilakukan KLT preparatif yang dimaksudkan untuk memeriksa jumlah pita yang terbentuk. Dimana dari hasil KLT preparatif dengan menggunakan eluen *wasbenzen*-kloroform (1:9v/v) diperoleh sebanyak 5 pita termasuk pita ditempat penotolan (pita 1).



Gambar 3. Bercak pada kromatogram hasil fraksinasi pengembangan dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1: 9v/v), fase diam silika gel F₂₅₄ setelah disemprot dengan larutan DPPH 0,2%



Gambar 4. Kromatogram hasil KLT preparatif dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1: 9v/v), fase diam silika gel PF₂₅₄ yang diamati dengan sinar (a) tampak, (b) UV₂₅₄ dan (c) UV₃₆₆

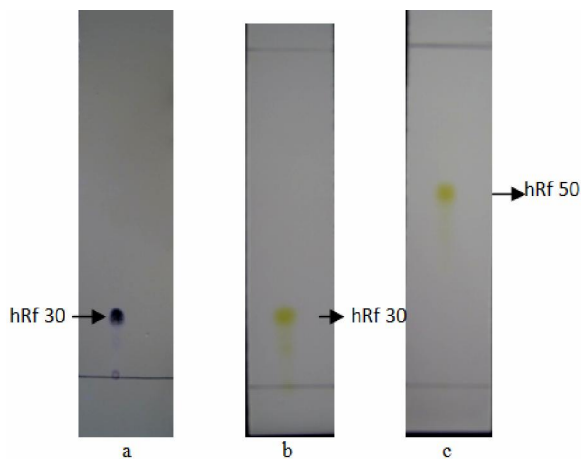
Tabel II Data kromatogram hasil KLT preparatif dengan fase gerak *wasbenzen* dan kloroform (1: 9v/v), fase diam silika gel PF₂₅₄

No bercak	hRf	UV ₂₅₄	UV ₃₆₆
1	0	Coklat	Biru lemah
2	32	Kuning	Kuning lemah
3	35	lemah	Kuning terang
4	72	Kuning	Ungu
5	77	terang	Ungu kemerahan
		-	-

Dari data KLTP diperoleh 5 pita (bercak) yang masing-masing pita mempunyai warna yang berbeda – beda. Pada gambar 4 terlihat pita no 3 menunjukkan warna kuning yang spontan setelah disemprot DPPH 0,2% sedangkan pita no 2 warna kuning timbul sesudahnya.

Hasil uji kemurnian isolat

Isolat yang didapat diuji kemurniannya secara KLT menggunakan 3 fase gerak *wasbenzen* - kloroform (1:9v/v), fase gerak n-heksan – etil asetat (4:1v/v) dan kloroform–etil asetat (6:1v/v).



Gambar 5. Kromatogram hasil uji kemurnian dengan fase diam silika gel F₂₅₄ dan variasi fase gerak

Keterangan :

- A. *Wasbenzen*-kloroform (1:9v/v) deteksi serum sulfat
- B.n-heksan-etil asetat (4:1v/v) deteksi DPPH 0,2 %
- C.Kloroform-etil asetat (6:1v/v) deteksi DPPH 0,2 %

Hasil pengujian menunjukkan adanya bercak dengan hRf berturut-turut 30; 30 dan 50. .

Hasil uji aktivitas isolat sebagai antioksidan penangkap radikal

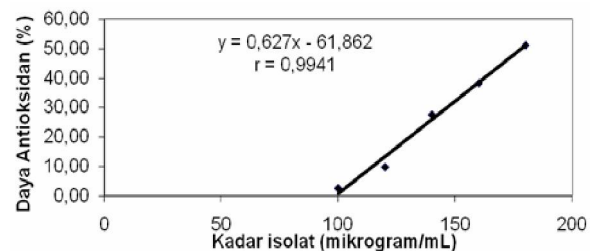
Tahap ini dimaksudkan untuk mengetahui potensi isolat sebagai antioksidan penangkap radikal. Hasil yang diperoleh dibandingkan aktivitasnya terhadap kuersetin. Penggunaan kuersetin sebagai kontrol positif karena kuersetin merupakan flavonoid yang telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang poten karena adanya gugus hidroksi fenolik dalam struktur molekulnya (Demirezer *dkk*, 2001 ; Kwon dan Kim, 2003).

Aktivitas antioksidan penangkap radikal ditentukan dengan menggunakan DPPH, suatu radikal yang stabil dalam larutan air atau metanol dan mampu menerima sebuah elektron atau radikal hidrogen untuk menjadi suatu molekul diamagnetik yang stabil. DPPH pada uji ini

ditangkap oleh antioksidan yang mendonorkan hidrogen, sehingga membentuk DPPH-H tereduksi. Warna berubah dari violet menjadi kuning dan diikuti penurunan serapan pada panjang gelombang 517nm.

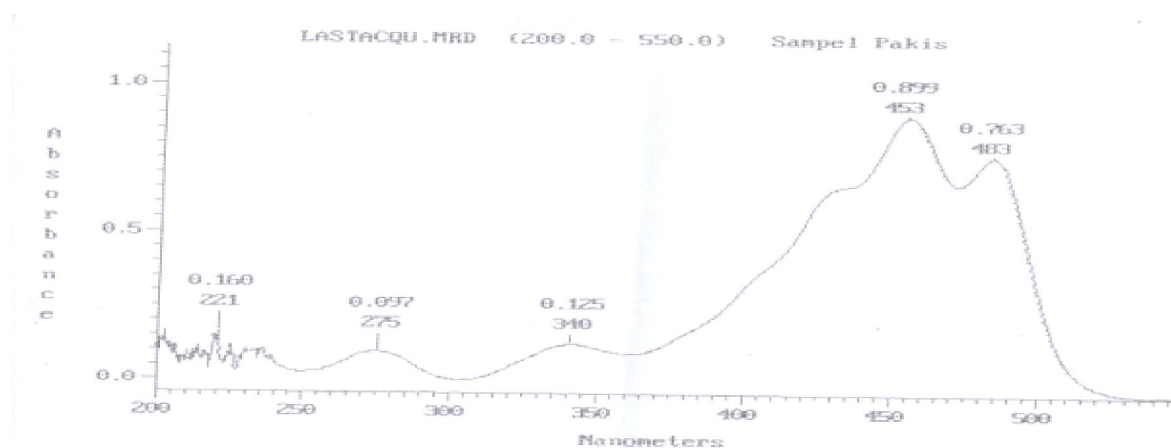
Aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC₅₀ yaitu konsentrasi senyawa antioksidan yang menangkap 50% radikal DPPH selama waktu reaksi. Nilai IC₅₀ yang makin kecil menunjukkan aktivitas antioksidan yang makin efektif. Hasil pengujian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi pelarut, maka semakin tinggi persentase inhibisinya, hal ini disebabkan pada sampel yang semakin banyak, maka semakin tinggi kandungan antioksidannya sehingga berdampak juga pada tingkat penghambatan radikal bebas yang dilakukan oleh senyawa antioksidan.

Uji aktivitas antioksidan metode DPPH terhadap isolat batang pakis pada konsentrasi 100, 120, 140, 160 dan 180µg/mL, diperoleh IC₅₀ sebesar 178,4µg/mL lebih besar dari kuersetin yaitu 2,82µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa isolat batang pakis dan kuersetin mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat karena mempunyai IC₅₀ kurang dari 200µg/mL (Blouis, 1958). Pengujian aktivitas antioksidan pada berbagai konsentrasi ternyata pada konsentrasi yang tertinggi menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi tetapi apabila dibandingkan dengan kuersetin, isolat batang pakis mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah.



Gambar 6. Kurva daya anti oksidan (%) vs kadar isolat (µg/mL)

Dari data kurva regresi isolat aktif menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang erat antara konsentrasi dengan % daya antioksidan (% inhibisi). Hal ini diperlihatkan dengan nilai R² (koefisien korelasi) di atas 0,9. Nilai R² menyatakan bahwa terdapat korelasi antara konsentrasi sampel dengan % inhibisi yang diamati dengan derajat keeratan untuk isolat aktif sebesar 0,9941. Ini menunjukkan bahwa lebih dari 99% derajat penghambatan dipengaruhi oleh konsentrasi bahan, sedangkan kurang dari 1% dipengaruhi oleh faktor lain.

Gambar 7. Spektra visibel (CHCl₃) isolat batang *Alsophila glauca* J.Sm

Tabel III. Data konsentrasi isolat aktif dan persen aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH

KADAR µg/mL	ABSORBANSI			Aktivitas Antioksidan (%)			Rata-rata
	I	II	III	I	II	III	
Kontrol	0,850	0,838	0,847				
100	0,826	0,820	0,821	2,82	2,15	3,07	2,68
120	0,769	0,758	0,758	9,53	9,55	10,51	9,86
140	0,602	0,612	0,621	29,18	26,97	26,68	27,61
160	0,517	0,524	0,523	39,18	37,47	38,25	38,30
180	0,412	0,405	0,421	51,53	51,67	50,30	51,17

Tabel IV. Nilai IC₅₀ hasil pengujian aktivitas antioksidan isolat batang pakis

No	Nama bahan	IC ₅₀ (µg/mL)
1	Isolat	178,4
2	Kuersetin	2,82

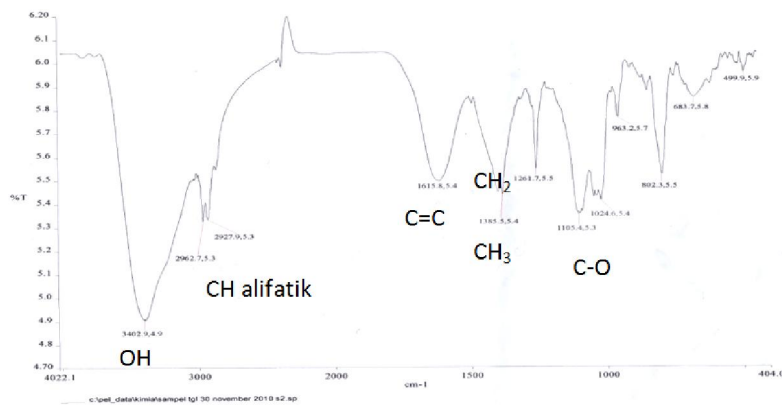
Tabel V. Data GC-MS isolat batang *Alsophila glauca* J.Sm

Puncak	Rt (menit)	Area (%)	Senyawa
1	15,503	24,62	4-fluoro-1,2-xylene
2	15,737	12,53	4-oxo-alpha-ionone.
3	16,126	28,72	-
4	17,165	7,06	Loliolide
5	18,879	5,28	Methanone, cyclohexyl-1H-imidazol-4-yl.
6	23,942	21,80	-

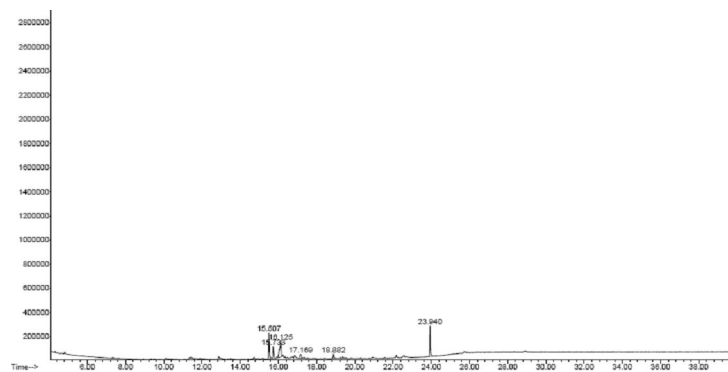
Identifikasi senyawa Spektra ultra violet

Hasil analisis isolat menggunakan spektrofotometer UV-vis memberikan serapan maksimum pada beberapa panjang gelombang. (λ maks) 221 yang merupakan panjang gelombang pelarut, 275nm, 340nm, 453nm dan 483nm yang kemungkinan merupakan absorbansi isolat aktif.

Pada gambar 7 terlihat adanya 4 puncak serapan maksimum hal ini menunjukkan bahwa didalam hasil isolat batang pakis tidak hanya mengandung 1 senyawa tetapi ada beberapa senyawa. Menurut Gandjar dan Rohman (2007) jenis transisi 200–700nm adalah transisi $n \rightarrow \pi^*$ dan $\pi \rightarrow \pi^*$. Hal ini menunjukkan bahwa struktur isolat aktif memiliki gugus kromofor atau ikatan



Gambar 8. Spektra Infra Merah (KBr) isolat batang *Alsophila glauca* J.Sm



Gambar 9. Gas kromatogram isolat batang *Alsophila glauca* J.Sm

rangkap terkonjugasi, sehingga mengakibatkan senyawa isolat aktif berpendar pada deteksi awal menggunakan UV₂₅₄ dan meredam pada UV₃₆₆.

Dari spektra diatas dapat dilihat adanya serapan kuat (*strong*) pada 3402,9 cm⁻¹ yang merupakan pita uluran OH, hal ini menunjukkan adanya gugus (-OH) dan diperkuat dengan adanya pita serapan sedang (*moderat*) pada 1105,4 cm⁻¹ yang menunjukkan ikatan C-O dan serapan yang lemah (*weak*) pada 1261,7cm⁻¹.

Vibrasi C-H luar bidang tak jenuh ditunjukkan pada 963,2cm⁻¹ sedangkan serapan pada 1615,8cm⁻¹ merupakan vibrasi ikatan rangkap C=C. Vibrasi *stretching* dan *bending* dari metil (CH₃) ditunjukkan pada 1385,5 dan serapan pada 2927,9cm⁻¹ menunjukkan adanya -CH *bending* yang merupakan hidrokarbon alifatik siklik (lingkar) dan dipertegas adanya serapan pada daerah 1400 cm⁻¹ untuk metilen dan 1385,5cm⁻¹ untuk metil (Silverstein *dkk.*, 1991). Dari data ini menunjukkan bahwa dalam struktur isolat aktif kemungkinan mengandung senyawa -OH, -CH₃ dan C=CH₂.

Spektra GC-MS

Kromatogram isolat aktif menunjukkan 6 puncak dengan intensitas relatif cukup besar seperti puncak senyawa dengan waktu retensi (tr) berturut-turut 15,503; 15,737; 16,126; 17,165; 18,879 ; 23,942. Data yang menunjukkan terdapatnya 6 puncak kromatogram yang dihasilkan mengindikasikan bahwa isolat relatif belum murni. Perkiraan senyawa berdasarkan *libraries Wiley7Nist05.L* dan *libraries demo.1*

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa Isolat aktif batang *Alsophila glauca* J.Sm memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ 178,4µg/mL. Isolat aktif batang *Alsophila glauca* J.Sm belum murni sehingga masih diperoleh banyak senyawa antara lain senyawa 4-fluoro-1,2-xylene; 4-oxo-alpha-ionone; loliolide; methanone,cyclohexyl-1H-imidazol-4-yl.

DAFTAR PUSTAKA

- Rohdiana, D. 2001. Radical Scavengers Polyphenol. *Majalah Farmasi Indonesia*. **12** (1) : 53-58.
- Amarowich, R., Naczki, M. & Sahidi, F. 2000. Antioxidant Activity of Crude Tannins of Canola and Rapeseed hulls, *JAOCS*, **77** : 957-961.
- Rohman, A. & Riyanto, S. Antioxidant Activity of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) fruit extract, *Agritech* **25** (3) : 131-136.
- Sofnie, M., Chairul & Sumarny. 2003. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Secara Invitro. *M.F.I*, **14** (4) : 208-215.
- Molyneux, P. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakrin Journal Science Technologi* **26** (2).
- Utami, R.F. 2009. Efek Gel Batang Pakis Ikan terhadap Penyembuhan Luka Bakar Buatan pada Kelinci jantan. *Karya Tulis Ilmiah*. Akademi Farmasi Yarsi Pontianak.
- Kwon, Y.S., & Kim, C.M. 2003. Antioxidant Constituent from the Stem of *Sorghum bicolor*. *Arch. Pharm. Res.* **26** (7) : 535-539.
- Demirezer, L.O., Kruuzum-Uz, A., Bergere, I., Schiewe, H.J. & Zeeck, A. 2001. The Structures of Antioxidant and Cytotoxic Agents from Natural Source : Antraquinones and Tannin from Roots of *Rumex patientia*, *Phytochemistry*. **58**: 1213-1217.
- Blouis, M. S. 1958. Antioxidant Determinations By The Use Of a Stable Free Radical. *Nature*. 1199-1200.
- Gandjar, IG & Rohman. A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan 1. Penerbit Pustaka Pelajar. Jogjakarta.