

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAUN KESEMMEK (*Diospyros kaki* L.F) DENGAN METODE DPPH (2,2-DIFENIL-1 PIKRILHIDRAZIN)

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF KESEMMEK LEAVES (*Diospyros kaki* L.F) USING DPPH (2,2-DIPHENYL-1 PIKRYLHYDRAZINE) METHOD

Isnindar^{1,*}), Erna Prawita Setyowati² dan Subagus Wahyuono²

¹. Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Farmasi dan Keperawatan Universitas Tanjungpura, Pontianak

². Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM, Jogjakarta

ABSTRAK

Sejauh ini terdapat dua grup jenis antioksidan, yaitu antioksidan sintesis dan alami. Antioksidan alami saat ini merupakan antioksidan yang penting yaitu senyawa fenolik yang banyak diproduksi secara alami dari tanaman. Senyawa fenolat antioksidan merupakan antiradikal potensial, aktif karena mereka mampu memberikan hidrogen kepada radikal bebas dan mampu memutus rantai reaksi oksidasi lipid pada tahap awal. Penelitian ini bertujuan untuk mencari senyawa antioksidan alami dari daun kesemek (*Diospyros kaki* L.F) yang telah digunakan secara tradisional untuk mencegah penyakit. Untuk mendeteksi keberadaan senyawa antioksidan dalam suatu sampel ekstrak, dapat digunakan reagen DPPH (2,2-difenil-1-pykrilhidrazin) 2%. Penelitian ini diawali dengan maserasi serbuk daun kesemek (115 g) dengan metanol 3 kali selama 24 jam setiap kali pada suhu kamar. Ekstrak metanol cair yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sehingga diperoleh residu (ekstrak metanol) (fase I). Residu kemudian diekstraksi dengan CHCl_3 , sehingga diperoleh CHCl_3 larut (fase II) dan fraksi tidak larut (endapan). Fraksi tidak larut CHCl_3 kemudian diekstraksi dengan air yang memberikan fraksi larut (fase III) dan fraksi tidak larut air. Ketiga fraksi (fase I-III) dilakukan kromatografi dengan TLC, divisualisasi dengan sinar uv-254, 366 nm kemudian disemprot dengan DPPH. Fase II mengandung senyawa antiradikal paling kuat seperti yang ditunjukkan oleh perubahan warna kuning cepat dengan latar belakang ungu. Dengan preparatif KLT [SiO_2 CHCl_3 -EtOAc (1-4 v/v)], senyawa antiradikal berhasil diisolasi dan diidentifikasi sebagai senyawa fenolik tersubstitusi. Potensi sebagai antiradikal diukur secara spektrofotometri dibandingkan dengan vitamin C, hasil pengukuran menunjukkan bahwa isolat mempunyai IC_{50} pada 107,7 mg/mL, dan lebih rendah dari IC_{50} vitamin C (3,04 mg/mL).

Kata kunci: Daun kesemek (*Diospyros kaki* L.F), antioksidan, DPPH (2,2-difenil-1-pikrylhidrazin)

ABSTRACT

There are two groups of antioxidant resources, these are synthetic and natural antioxidants. The most important natural antioxidant is phenolic compounds that are produced naturally from plants. Phenolic Antioxidants are potent antiradical, biologically active as they are able to donate hydrogens to free radicals and break the chain of lipid oxidation reactions in the early stages. This study is aimed to search natural antioxidant compounds from the leaves persimmon (*Diospyros kaki* L.F) that have been utilized traditionally to prevent from sickness. In order to detect the presence of antioxidant compounds in the leaves extract, a reagent of DPPH (2,2-diphenyl-1-pykrilhidrazine) in methanol was used. Initially, powder of persimmon leaves (115 g) is macerated 3 times with methanol, 24 hours each time at room temperature. The liquid extract obtained is evaporated by rotavapor till residue (methanol extract) (phase I) is obtained. The residue was then extracted with CHCl_3 to give CHCl_3 soluble (phase II) and insoluble fractions. The later is then extracted with water to give water soluble (phase III) and insoluble fractions. These fractions (phase I-III) are chromatophed by TLC and sprayed by DPPH. Phase II contains antiradical compounds as shown by yellow color on the violet background. By preparative TLC [SiO_2 , CHCl_3 -EtOAc (1-4 v/v)], antiradical substance is isolated and identified tentatively as substituted phenolic compounds. Antiradical potential is measured spectrophotometrically, the isolat shows IC_{50} at 107.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ that is lower than that of vitamin C (3.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Key words: Persimmon leaves (*Diospyros kaki* L.F), antioxidant, DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrylhidrazine)

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara dengan mega biodiversity terbesar kedua setelah Brazil. Pada saat ini, sekitar 180 jenis telah digunakan untuk berbagai keperluan industri obat dan jamu. Tumbuhan yang berpotensi sebagai obat yang telah dibudidayakan saat ini masih sangat sedikit. Oleh karena itu, hutan Indonesia masih merupakan sumber plasma nutfah tumbuhan berkhasiat obat yang potensinya perlu digali secara sungguh-sungguh (Supriadi, 2001).

Studi antioksidan beberapa tanaman obat, baik sebagai senyawa isolat aktif alamiah maupun sintetik, sampai sekarang masih terus diupayakan. Ini perlu dilakukan mengingat prevalensi dan keberagaman penyakit degeneratif akibat pengaruh aktivitas *reactive oxygen species (ROS)* terus berkembang. Gulcin *et al.*, (2004) menyatakan bahwa konsumsi oksigen yang diperlukan dalam pertumbuhan sel menyebabkan penurunan spesies oksigen reaktif terutama radikal hidroksil dan radikal superoksida.

Kesemek merupakan keluarga *ebenaceae*. Pada pengobatan tradisional tanaman kesemek banyak digunakan untuk berbagai pengobatan seperti menurunkan tekanan darah, efek diuretik, batuk dan kemungkinan juga mengurangi penyakit degeneratif (Steinmetz and Potter, 1996). Selain itu juga dilaporkan pada buah dan biji buah memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Fukai, *et al.*, 2009, Lee, *et al.*, 2008, Jung, *et al.*, 2005).

Tambahan untuk nilai nutrisi buah kesemek mengandung kalsium, potasium, dan vitamin C (Mowat, 1990), Karakter terbanyak dari kandungan buah kesemek adalah tanin yang mana akan menghilang ketika buah masak. Buah kesemek juga berfungsi sebagai astringen karena mengandung tanin, selain itu juga kaya akan phenol yang berkhasiat sebagai antioksidan (Gorinstein, *et al.*, 1994)

Dilaporkan ekstrak biji buah memiliki aktivitas kuat sebagai *radical-scavenging activity* (Ahn, *et al.*, 2002).

Selain itu tanin juga bersifat antimutagenik, antikarsinogenik dan memiliki aktivitas antioksidan (Gali, *et al.*, 1988).

Berdasarkan atas informasi tersebut di atas dan untuk menunjang serta melengkapi informasi yang bermanfaat mengenai tanaman obat kesemek ini, maka dilakukan penelitian Uji

aktivitas antioksidan daun kesemek (*diospyros kaki*) dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kesemek, diambil dari tumbuhan kesemek yang tumbuh di Gunung Merapi, bahan pendukung yang digunakan sebagai pelarut dan fase gerak kromatografi adalah metanol, chloroform, etil asetat, dan n-hexan. Lempeng silika gel dan selulosa sebagai fase diam untuk kromatografi. Untuk uji antioksidan digunakan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), vitamin C. Serum Sulfat dan Kalium Bromida. Bahan kimia yang digunakan berderajat pro analisis E. Merck kecuali DPPH (dari Sigma, Chem.Co.)

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis Genesys 5 Milton Roy, Spektrofotometer UV-Vis Hitachi U-2800, Spektrofotometer Shimadzu FTIR-8201 PC, Spektrofotometer H-NMR Hitachi FT-NMR 1900, Neraca, Bejana kromatografi, pipa kapiler, blender, lampu UV, penangas air, mikropipet, eksikator, oven, dan peralatan gelas.

Cara Penelitian

Determinasi tumbuhan

Tumbuhan kesemek yang diteliti dideterminasi di laboratorium Biologi farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, menggunakan pustaka Bacher dan Bakhuizen van den Brink (1963) yang lazim digunakan untuk determinasi dan pemeriksaan morfologi.

Penyiapan bahan utama

Daun dipanen dari tanaman kesemek pada bulan Februari tahun 2010. Diambil daun yang sehat dan tidak terlalu muda dan berwarna hijau. Setelah dicuci dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan ditempat terbuka tetapi terlindung dari sinar matahari langsung, kemudian daun yang kering diserbuk dan disimpan dalam wadah kering.

Pembuatan ekstrak metanol

Serbuk daun kesemek kering sebanyak 115 g direndam dalam bejana selama 3x24 jam dengan pelarut metanol, setiap 1x24 jam pelarut diganti dan sesering mungkin dilakukan pengadukan. Kemudian filtrat disaring dan dipekatkan dengan penguap vakum hingga kental dan selanjutnya disebut ekstrak metanol.

*Korespondensi : Isnindar

Program Studi Farmasi Fakultas Ilmu Farmasi dan Keperawatan Universitas Tanjungpura, Pontianak
e-mail: isnindar@yahoo.com

Deteksi ekstrak metanol dengan KLT

Ekstrak metanol diidentifikasi secara kromatografi lapis tipis. Fase diam yang digunakan lempeng silika GF 254 dan dielusi dengan fase gerak yaitu kloroform-etil asetat (1:4 v/v). Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak, lampu UV 254 nm dan 366 nm, pereaksi DPPH 0,2% dan pereaksi serum(IV) sulfat.

Uji pendahuluan antioksidan penangkap radikal

Uji pendahuluan sebagai antioksidan penangkap radikal dilakukan sesuai metode Demirezer *et al.*, (2001) dengan sedikit modifikasi dengan cara kromatogram hasil KLT disemprot dengan larutan 0,2% DPPH dalam metanol. Kromatogram diperiksa 30 menit setelah penyemprotan. Senyawa aktif penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu.

Pemisahan secara partisi

Ekstrak metanol dilarutkan dalam pelarut kloroform didalam tabung reaksi kemudian divortex dan disentrifuge beberapa menit sehingga terbentuk endapan (tidak larut kloroform) dan filtrat (larut kloroform). Ekstraksi dengan metanol ini dilakukan 2 kali, kemudian Hasil endapan dan filtrat dipisahkan. Kemudian endapan disuspensikan dengan air, divortex dan disentrifuge untuk memisahkan fraksi larut dan tidak larut air,

Dari hasil pemisahan secara partisi diperoleh tiga fase yaitu fase larut kloroform (Fase I), fase larut metanol (Fase II) dan fase larut air (Fase III).

Pengujian hasil partisi adanya senyawa antioksidan penangkap radikal secara KLT

Ekstrak metanol dan hasil pemisahan partisi yang diperoleh pada fase I, fase II dan fase III di kromatografi lapis tipis (KLT) dalam satu lempeng (dibuat 2 perlakuan) kemudian di elusi dengan fase gerak kloroform-etil asetat (1-4). Bercak yang terbentuk diamati dengan sinar tampak, lampu UV 254 nm dan 366 nm. Dari profil TLC fase I-III yang divisualisasi dengan DPPH 0,2%, fase II mempunyai senyawa yang mampu menunjukkan reaksi perubahan warna cepat (kuning) dengan latar belakang ungu, artinya fase II mengandung senyawa aktif penangkap radikal bebas. Bercak senyawa penangkap radikal bebas ini juga memberikan bercak berwarna ungu kemerahan setelah disemprot dengan serum sulfat setelah dipanaskan.

Pemurnian isolat secara KLT Preparatif

Hasil uji partisi secara KLT yang positif DPPH 0,2% dipisahkan secara Kromatografi Lapis Tipis Preparatif (KLTP) dengan cara ditotolkan membentuk garis panjang pada plat KLTP dan

dielusi dengan fase gerak kloroform-etil asetat (1:4). Kromatogram yang dihasilkan dideteksi dengan sinar tampak, sinar UV 254 nm dan 366 nm kemudian ditandai. Bercak-bercak yang sudah ditandai masing-masing dikerok dan dipisahkan kemudian diekstraksi dengan metanol, disaring dan pelarut diuapkan sehingga diperoleh residu yaitu senyawa antiradikal bebas.

Pengujian isolat adanya senyawa antioksidan penangkap radikal secara KLT

Pengujian isolat antioksidan kembali dilakukan secara KLT kembali, senyawa aktif penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu setelah disemprot dengan pereaksi DPPH 0,2% dan berwarna ungu kemerahan setelah disemprot dengan serum sulfat setelah dipanaskan, dan keduanya menunjukkan hRf yang sama. Artinya bahwa senyawa antiradikal diduga sebagai senyawa fenolik terkonjugasi.

Kemurnian isolat diuji secara KLT menggunakan tiga fase gerak yang berbeda yaitu n-heksan-metanol, kloroform-etil asetat dan kloroform-metanol dengan berbagai perbandingan. Nilai Hrf yang ditunjukkan berbeda-beda namun masing-masing diperoleh bercak tunggal yang homogen baik visualisasi dengan DPPH 2% ataupun dengan penampak bercak Serum(IV)sulfat.

Pengujian aktivitas antioksidan penangkap radikal dari isolat

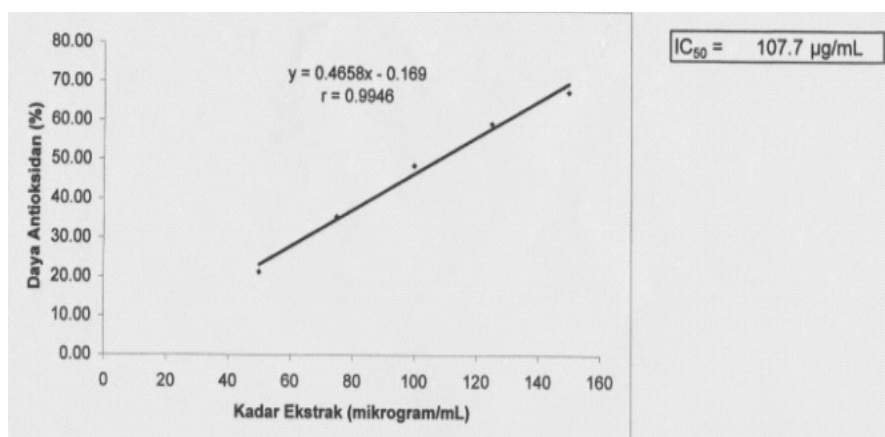
Uji aktivitas antioksidan penangkap radikal dilakukan terhadap isolat yang telah diperoleh dan dilakukan dengan metode Kwon and Kim (2003) yaitu secara spektrofotometri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

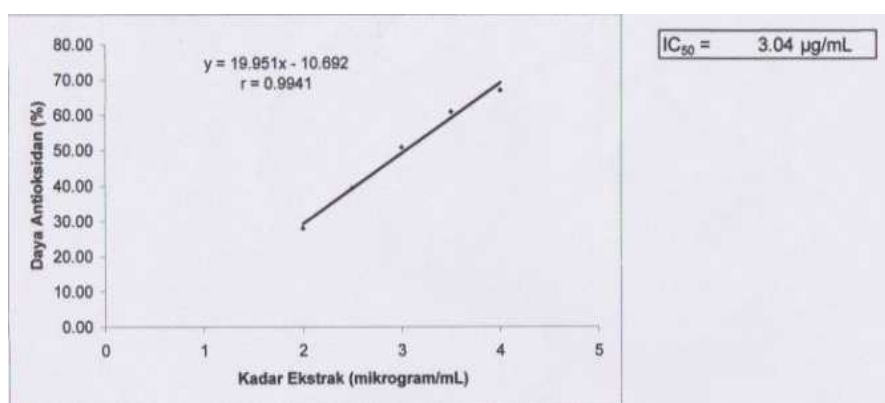
Aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC₅₀ senyawa antioksidan. Nilai IC₅₀ adalah kemampuan senyawa antioksidan menangkap 50% radikal bebas DPPH selama *operating time*. Nilai IC₅₀ diperoleh dari *plotting* terhadap persamaan regresi linear dengan (x) sebagai konsentrasi sampel dan (y) adalah persen aktivitas antioksidan. Semakin kecil nilai IC₅₀, semakin poten aktivitas Antioksidan senyawa tersebut.

Berdasarkan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH didapat data sebagai berikut tercantum pada tabel I dan II.

Data pada tabel I menunjukkan bahwa untuk menangkap radikal DPPH sejumlah 50% diperlukan kadar sebesar 107,7 µg/mL. Hal ini membuktikan bahwa isolat dari ekstrak metanol daun kesemek mempunyai aktivitas antioksi dan



Gambar 1. Kurva regresi linier isolat daun kesemek dengan rata-rata aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.



Gambar 2. Kurva regresi linier vitamin c dengan rata-rata aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

Tabel I. Data aktivitas daun kesemek dengan metode DPPH

Kadar (µg/mL)	Rata-rata aktivitas antioksidan (%)
50	21,26
75	35,42
100	48,52
125	59,33
150	67,53

Tabel II. Data aktivitas vitamin C

Kadar (µg/mL)	Rata-rata aktivitas antioksidan (%)
2	27,91
2,5	39,27
3	50,76
3,5	60,88
4	66,99

sedang, dan dimungkinkan adanya kandungan senyawa fenolik seperti flavonoid, asam fenolat dan diterpen fenolik. Aktivitas antioksidan senyawa fenolik bertumpu pada kemampuan redoks yang dimilikinya sehingga mampu menyerap dan menetralkan radikal bebas, mengikat singlet dan triplet oksigen, maupun mendekomposisi peroksida (Javanmardi *et al.*, 2003).

Vitamin C dalam penelitian ini digunakan sebagai kontrol positif untuk membuktikan bahwa metode yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan adalah benar.

Persamaan Regresi Linier

Isolat daun kesemek

$$Y = 0,4658x - 0,169$$

$$r = 0,9946$$

Vitamin C

$$Y = 19,951x - 10,692$$

$$r = 0,9941$$

Dimana x : Kadar sampel, dan Y : aktivitas antioksidan (%)

$$IC_{50} \text{ Isolat} = 107,7 \mu\text{g/mL}$$

$$IC_{50} \text{ Vitamin C} = 3,04 \mu\text{g/mL}$$

Analisis kualitatif dengan metode kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia dalam tumbuhan yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antioksidannya terutama fenol dan flavonoid.

Selanjutnya daun kesemek dalam bentuk ekstrak, hasil partisi dan isolat masing-masing di kromatografi lapis tipis dengan fase gerak $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ (1:4 v/v) memberikan respon positif DPPH dengan R_f 47, demikian pula hasil kromatogram yang disemprot dengan penampak bercak serum sulfat juga memiliki R_f yang sama.

Pada uji kemurnian isolat menggunakan tiga fase gerak yaitu n-heksan-EtOAc (1:2v/v), $\text{CHCl}_3:\text{EtOAc}$ (1:4 v/v), dan $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:5 v/v) diperoleh R_f yang berbeda-beda yaitu 33, 47 dan 70. Jarak pengembangan yang digunakan adalah 8 cm, penotolan menggunakan pipa kapiler.

KESIMPULAN

Aktivitas antioksidan isolat dari ekstrak metanol daun kesemek termasuk dalam klasifikasi sedang hal ini ditandai dengan nilai IC_{50} sebesar

107,7 $\mu\text{g/mL}$ yang jauh dibawah nilai IC_{50} vitamin C (3,04 $\mu\text{g/mL}$).

DAFTAR PUSTAKA

- Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim YH, Park DK (2002). Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: in vitro and in vivo. *Nutr. Res.* 22:1265-1273.
- 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.
- Fukai S, Tanimoto S, Maeda A, Fukuda H, Okada Y, Nomura M (2009). Pharmacological activity of compounds extracted from persimmon peel (*diospyros kaki* THUNB.). *J. Oleo Sci.* 58:213-219.
- Gali, H. U., Perchellet, E. M., Klish, D. S., Johnson, J. M., and Perchellet, J. P. (1992). Hidrilyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in vivo. *International Journal of Cancer*, 51, 425-432.
- Gorinstein, S., Zemser, M., Weist, M., Halevy, S., Deutsch, J., Tilus, K., Feintuch, D., Guerra, N., Fishman, M., and Bartnikowska, E (1994), *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1087-1092.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E., Vivanco, JM. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of Iranian Ocimum Accessions. *J Food Chem.* 2003. (83) : 547-50.
- Kwon, Y.S., and Kim, C.M., 2003, Antioksidant Constituents from the Steam of Sorghum bicolor, *Arch. Pharm. Res.*, 26 (7) : 535-539.
- Mowat, A. 1990. Charting the future, proceedings of the first national non-adstringent persimmon industry workshop. Gatton College: The university of Queensland.
- Steinmetz KA, and Potter JD (1996). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *J. Am. Diet. Assoc.* 53: 536-543.
- Supriadi, 2001, *Tumbuhan Obat Indonesia ; Penggunaan dan khasiatnya*, hal.56-58, Yayasan Obor Indonesia, Jakarta.