

Isolasi dan Aktivitas Antioksidan Fraksi dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays*)

Isolation and Antioxidant Activity of The Fractions of Corncob (*Zea mays*) Extract

Edi Suryanto, Lidya Irma Momuat

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sam Ratulangi,
 Jl. Kampus Unsrat, Kleak, Manado, Sulawesi Utara 95115, Indonesia
 Email: edisuryanto@yahoo.com

Submisi: 25 November 2015; Penerimaan: 28 Juni 2016

ABSTRAK

Tongkol jagung merupakan salah satu limbah tanaman pangan yang mempunyai kandungan fitokimia yang bermanfaat untuk kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fraksi fenolik dari ekstrak tongkol jagung dan menentukan aktivitas antioksidan. Tongkol jagung diekstraksi dengan cara refluks menggunakan etanol 80% selama 2 jam. Setelah itu disaring dan filtratnya diuapkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak etanol disuspensikan dalam air dan diekstraksi berturut turut dengan petroleum eter, etil asetat, butanol, dan air. Fraksi pelarut terbaik difraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 dan eluen n-heksana : etil asetat (4:6). Ekstrak tongkol jagung dan fraksi dievaluasi kandungan total fenolik, aktivitas penangkal radikal bebas (uji 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dan kapasitas total antioksidan (uji *ferric reducing ability of plasma*). Hasil uji kandungan total fenolik menunjukkan bahwa fraksi etil asetat (163,57 µg/mL) memiliki kandungan total fenolik yang paling tinggi daripada fraksi butanol (83,30 µg/mL), ekstrak etanol (81,53 µg/mL), fraksi air (23,71 µg/mL) dan fraksi petroleum eter (23,57 µg/mL). Hasil ini juga menunjukkan bahwa fraksi etil asetat mempunyai aktivitas penangkal radikal dan kapasitas total antioksidan paling tinggi daripada fraksi butanol, ekstrak etanol, fraksi air, dan fraksi petroleum eter. Aktivitas penangkal radikal bebas fraksi II dan III memperlihatkan paling kuat daripada fraksi V, I, IV dan VI. Hasil penelitian ini menyarankan bahwa fraksi etil asetat dan fraksi II mengandung senyawa fenolik yang mempunyai aktivitas antioksidan kuat.

Kata kunci: Aktivitas antioksidan; tongkol jagung; ekstraksi; fraksi; komponen fenolik

ABSTRACT

The corn cob is one of the food waste-material having phytochemical component that of health benefit. The objectives of the research were to isolate phenolic fractions of the corn cob extract and to determine antioxidant and antiphotooxidant activities. The corn cob was extracted with reflux method using ethanol 80% for 2 hours. After that the extracts were filtered and the filtrates were combined and concentrated on rotary evaporator. This crude ethanolic extract was suspended in water and extracted with petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water, respectively. The best fractions of partition fractionated with column chromatography using silica gel 60 and n-hexane: ethyl acetate (4:6). Corncob extract and fraction were evaluated for total phenolic content free radical scavenging activity (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical assay) and total antioxidant capacity (ferric reducing ability of plasma assay). The results of total phenolic content showed that ethyl acetate fraction (163.57 µg/mL) has higher phenolic content than butanol fraction (83.30 µg/mL), ethanol extract (81.53 µg/mL), water fraction (23.71 µg/mL) and petroleum ether fraction (23.57 µg/mL). The results also showed that ethyl acetate fraction has highest free radical scavenging activity and total antioxidant capacity than butanol fraction, ethanol extract, water fraction and petroleum ether fraction. The free radical scavenging activity of fractions II and III exhibited strongest activity than fraction V, I, IV and VI. The results also showed that fraction II has highest total antioxidant capacity than I, III, IV, VI, and V. The results suggest that the ethyl acetate fraction and fraction II contains phenolic compounds which possess antioxidant activities.

Keywords: Antioxidant activity; corncob; extraction; fractions; phenolic compound

PENDAHULUAN

Spesies oksigen reaktif (SOR) dapat diklasifikasikan menjadi oksigen radikal dan oksigen non radikal. Oksigen yang bersifat radikal antara lain anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$), radikal hidroksil ($\cdot OH$), radikal alkoksil ($RO\cdot$) dan radikal peroksil ($ROO\cdot$), sedangkan oksigen yang non radikal terdiri atas hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen singlet (1O_2). Dalam sistem biologis, SOR dapat dihasilkan pada waktu metabolisme normal dan menghasilkan energi dalam tubuh serta mempunyai potensi untuk bereaksi dengan hampir semua bentuk molekul dalam sel hidup. Walaupun dalam setiap organisme sudah ada sistem pertahanan intraseluler seperti superoksida dismutase (SOD), katalase, reduktase dan glutathion peroksidase (Halliwell dan Gutteridge, 2001) yang dapat menangkal sifat bahaya dari SOR, tetapi paparan bahan kimia dan kontaminan terus menerus dapat mengalami peningkatan sejumlah radikal bebas dalam tubuh sehingga melebihi kapasitasnya dan ini dapat menyebabkan terganggunya sistem keseimbangan oksidatif. Kondisi ini bisa berhubungan dengan sejumlah penyakit metabolik termasuk penyakit diabetes, kanker dan kardiovaskular (Ames dan Shigenaga, 1993).

Menurut Halliwell dan Gutteridge (2001), metode yang efektif untuk mengurangi atau mencegah stress oksidatif adalah pemberian suatu bahan antioksidatif yang dapat melawan stress oksidatif akibat reaksi radikal bebas dengan molekul biologi seperti lipida, DNA, enzim dan protein (Halliwell dan Aruoma, 1997). Tanaman obat dan pangan banyak dikonsumsi sebagai bahan makanan yang sangat luas dimanfaatkan sebagai sumber bahan antioksidan. Hal ini disebabkan kandungan metabolit sekunder mampu menghambat atau menunda oksidasi dari substrat teroksidasi dalam reaksi berantai dalam sistem tubuh sehingga mencegah terjadinya banyak penyakit (Halliwell dkk., 1995). Berdasarkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman obat dan pangan mengandung senyawa fenolik, flavonoid dan tannin yang mempunyai kapasitas untuk menangkal radikal bebas yang disebabkan kemampuannya sebagai pemberi elektron atau hidrogen sehingga menjadi molekul non radikal yang stabil (Amic dkk., 2003).

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu jenis tanaman pangan yang sudah lama dikenal dan dibudidayakan di negara-negara berkembang, khususnya di Indonesia. Pemanfaatan biji jagung sebagai sumber pangan dapat menghasilkan tongkol jagung yang pada umumnya dibuang sebagai limbah atau hanya digunakan sebagai pakan ternak dan bahan bakar dapur. Tongkol jagung merupakan bagian terbesar dari buah jagung, sehingga produksi jagung pipilan dalam jumlah yang besar dapat menghasilkan limbah tongkol jagung yang cukup banyak. Menurut Direktorat Jenderal

Tanaman Pangan (2014), produksi jagung Nasional tahun 2014 mencapai 19,03 juta ton, dan dapat diperkirakan jumlah tongkol jagung yang dihasilkan sekitar 13 juta ton. Dari beberapa penelitian yang telah dilakukan menyatakan bahwa limbah tongkol jagung mengandung senyawa fenolik yang mempunyai potensi sebagai antioksidan atau penangkal radikal bebas. Lumempouw dkk. (2012a), Lumempouw dkk. (2012b) dan Saleh dkk. (2012) melaporkan bahwa ekstrak etanol dari tongkol jagung dapat berperan sebagai antioksidan dan tabir surya (anti UV-B). Selain itu, hasil penelitian Wungkana dkk. (2013) menyatakan bahwa fraksi fenolik dari tongkol jagung dapat berperan sebagai penangkal radikal bebas DPPH dan sekaligus sebagai tabir surya. Suryanto dkk. (2013) melaporkan bahwa tongkol jagung mempunyai potensi sebagai penstabil oksigen singlet dan dapat berperan sebagai tabir surya. Tujuan penelitian ini untuk mengisolasi dan menguji aktivitas antioksidan fraksi fenolik yang terdapat dalam ekstrak tongkol jagung.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Sampel tongkol jagung diperoleh dari perkebunan rakyat di Tomohon dan jenis jagung yang digunakan ialah jagung manis varietas hibrida. Bahan kimia yang digunakan yaitu, metanol, etanol, etil asetat, *n*-butanol, asam galat, natrium karbonat, reagen Folin-Ciocalteu, natrium asetat, asam asetat, asam klorida, besi (III) klorida, besi (II) sulfat yang diperoleh dari Merck (Darmstadt, Germany). 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) diperoleh dari Sigma (St. Louis, USA). 2,4,6 tri-pyridyl-s-triazine (TPTZ) diperoleh dari Fluka, Chemic AG (Deisenhoten, Switzerland). Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat refluks, *rotary evaporator*, spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1700).

Preparasi Sampel

Sebelum dilakukan analisis, sampel segar tongkol jagung dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan selama 4 minggu. Setelah kering digiling menjadi serbuk dengan alat penggiling. Setelah itu, serbuk tongkol jagung diayak dengan ukuran 40 mesh dengan kadar air sebesar 10,23% selanjutnya disimpan dalam kantong-kantong plastik sebelum diperlakukan.

Ekstraksi dan Fraksinasi dengan Pelarut

Serbuk tongkol jagung diekstraksi menggunakan teknik ekstraksi refluks (Suryanto dkk., 2013). Sebanyak 200 g serbuk tongkol jagung diekstraksi dengan etanol 80% (2 x 2 L) menggunakan cara direfluks pada suhu 80-90 °C selama 2 jam. Filtrat hasil penyaringan diuapkan menggunakan rotary

evaporator hingga diperoleh ekstrak kental tongkol jagung. Selanjutnya ekstrak pekat tongkol jagung dilarutkan dalam akuades dan dipartisi berturut-turut dengan petroleum eter (2 x 100 mL), etil asetat (2 x 100 mL), *n*-butanol (2 x 100 mL) dan residu (air) sehingga menghasilkan rendemen 15,49; 20,54; 14,16 dan 49,01%. Tujuan metode partisi ini adalah untuk memperoleh sekumpulan senyawa kimia dengan tingkat polaritas yang berbeda yang terdapat dalam ekstrak pekat tongkol jagung.

Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom

Pemisahan hasil terbaik partisi yang berdasarkan kandungan total fenolik dan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan kromatografi kolom. Sebelum dilakukan fraksinasi dengan kromatografi kolom terlebih dahulu dilakukan analisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) silica gel 60 F₂₅₄ untuk mendapatkan perbandingan eluen yang sesuai antara *n*-heksan dan etil asetat, yaitu dengan perbandingan 9:1, 8:2, 7:3, 3:7, 2:8 dan 1:9. Setelah didapat eluen yang sesuai (dilihat dari pola pemisahan noda), dilanjutkan dengan kromatografi kolom dengan fase diam berupa silica gel 60 sebanyak 25 g untuk 1 g hasil terbaik partisi. Pemisahan menggunakan kromatografi kolom yang berdiameter 1,5 cm dengan panjang kolom 50 cm dengan eluen yang diperoleh dari analisis terbaik dari KLT. Fraksi-fraksi yang didapat pada pemisahan ditampung dalam tabung setiap 10 mL per subfraksi selanjutnya dianalisis dengan spektrofotometer UV dan setiap subfraksi yang memiliki pola absorbansi yang sama pada λ 280 nm (untuk golongan senyawa fenolik) digabung menjadi fraksi (Shahidi dan Wettasinghe, 2000). Setiap fraksi disimpan dalam tabung pada 0 °C sampai digunakan untuk pengujian total fenolik, aktivitas penangkal radikal bebas, total antioksidan dan penstabilan oksigen singlet.

Penentuan Kandungan Total Fenolik

Kandungan total fenolik dari ekstrak dan fraksi tongkol jagung ditentukan dengan metode Jeong dkk. (2004). Sampel masing-masing ekstrak, fraksi pelarut dan fraksi sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 1 mL reagen Folin-Ciocalteu (50%) dalam tabung reaksi dan kemudian campuran ini divortex selama 3 menit. Setelah interval waktu 3 menit, 2 mL larutan Na₂CO₃ 2% ditambahkan. Selanjutnya campuran disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Absorbansi sampel dibaca dengan spektrofotometer pada λ 750 nm. Hasilnya dinyatakan sebagai ekuivalen asam galat dalam μ g/mL ekstrak. Kurva kalibrasi dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan asam galat sebagai standar.

Penentuan Penangkal Radikal Bebas DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan menggunakan metode penangkal radikal bebas DPPH Gaulejac dkk.

(1998). Dipersiapkan sebanyak 2 mL larutan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) 93 μ M dalam etanol dan ditambahkan 0,5 mL ekstrak, fraksi pelarut dan fraksi. Berubahnya warna larutan dari ungu ke warna kuning menunjukkan efisiensi penangkap radikal. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit dan absorbansi diukur pada λ 517 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas penangkal radikal bebas dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan persamaan:

$$\text{Aktivitas penangkal radikal bebas DPPH (\%)} = \left[1 - \frac{\text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

Penentuan Total Antioksidan

Penentuan total antioksidan ditentukan menurut metode *ferric reducing ability of plasma* (FRAP) (Benzie dan Strain, 1996; Halvorsen dkk., 2001). Pengukuran dilakukan dengan mengambil 0,1 mL ekstrak atau fraksi yang dilarutkan dalam etanol dicampurkan dengan 3 mL reagen FRAP dalam keadaan segar. Kemudian campuran dikocok dengan alat *vortex* dan setelah itu, segera dilakukan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 593 nm. Reagen FRAP selalu dipersiapkan dalam keadaan segar dengan mencampurkan 2,5 mL, 10 mM larutan 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina (TPTZ) dalam 40 mM HCl dengan 2,5 mL, 20 mM larutan FeCl₃ 6H₂O dan 2,5 mL, 0,3 M buffer asetat pada pH 3,6. Kandungan total antioksidan dinyatakan sebagai ekuivalen Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ dalam μ mol/L ekstrak. Untuk membuat kurva standar dipersiapkan pada cara yang sama menggunakan larutan FeSO₄ dengan konsentrasi antara 100-1000 μ mol/L.

Analisis Statistik

Semua data eksperimen dilakukan dua kali ulangan dan hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata \pm SD. Apabila perlakuan berpengaruh nyata, pengujian beda rata-rata perlakuan dilanjutkan dengan uji beda rata-rata dengan DMRT (*Duncan's multiple range test*). Analisis dilakukan menggunakan *software* SPSS versi 18.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak tongkol jagung yang dipartisi dengan berbagai pelarut seperti petroleum eter, etil asetat, butanol dan air telah dilaporkan sebelumnya (Maanari dkk., 2014). Hasilnya menunjukkan bahwa persentase rendemen tertinggi diperoleh pada fraksi air sedangkan rendemen terendah terdapat pada fraksi butanol. Tingginya rendemen untuk fraksi air mungkin disebabkan hadirnya beberapa jenis gula, glikosida, karbohidrat dan saponin yang strukturnya kompleks dengan berat molekul tinggi yang larut air. Dari hasil persentase rendemen menunjukkan juga bahwa ekstrak memiliki

komponen terbesar berupa senyawa sangat polar yang lebih banyak larut dalam pelarut sangat polar seperti air. Oleh karena itu, hasil ini mengindikasikan bahwa tongkol jagung mengandung lebih banyak komponen yang sangat polar daripada senyawa polar, semi polar dan non polar. Data ini juga menyarankan bahwa pelarut air memberikan rendemen ekstraksi tertinggi daripada pelarut lain seperti petroleum eter, etil asetat dan butanol.

Aktivitas Penangkal Radikal Bebas Fraksi Pelarut

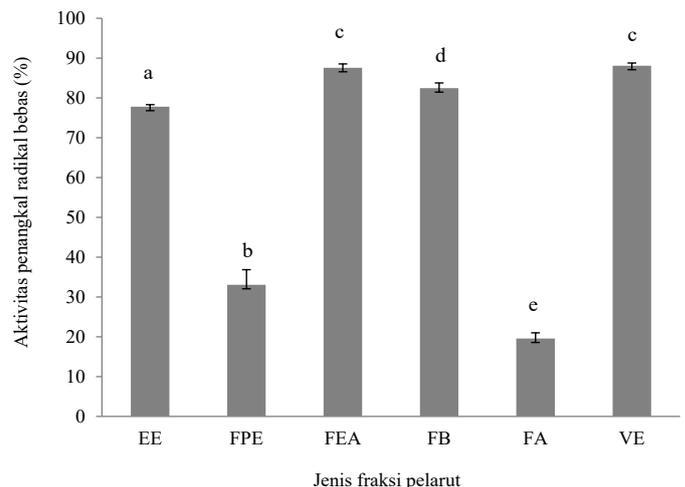
Pengujian dengan radikal 1,1-difenil-2-picrylhidrazy (DPPH) digunakan untuk menentukan aktivitas penangkal radikal bebas dari ekstrak tanaman maupun senyawa murni. Radikal DPPH adalah radikal bebas stabil yang dapat larut dalam metanol atau etanol serta menunjukkan karakteristik pada panjang gelombang 515-517 nm. Pada metode ini dapat dilihat kemampuan dari ekstrak, fraksi atau senyawa murni sebagai antioksidan primer, ketika antioksidan tersebut dapat menangkai radikal bebas melalui pemberian hidrogen kepada radikal bebas DPPH yang berwarna ungu akan berubah menjadi non radikal yang berwarna kuning. Semakin berkurangnya warna ungu menunjukkan bahwa kemampuan antioksidan tersebut untuk menangkai radikal bebas DPPH semakin kuat (Molyneux, 2004). Pengujian aktivitas penangkal radikal bebas dari ekstrak etanol (EE), fraksi petroleum eter (FPE), etil asetat (FEA), butanol (FB) dan air (FA) menggunakan konsentrasi 1 mg/mL dapat dilihat pada Gambar 1.

Dari Gambar 1 memperlihatkan bahwa fraksi etil asetat (FEA) memiliki kemampuan sebagai penangkal radikal bebas DPPH yang paling tinggi dibandingkan fraksi butanol, ekstrak etanol, fraksi petroleum eter dan fraksi air. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelima pelarut dengan perbedaan polaritas memberikan persentase penangkal radikal bebas yang berbeda. Hasil persentase penangkal radikal bebas dari FEA, FB, EE, FPE dan FA berturut-turut adalah 87,57; 82,45; 78,31; 33,07; dan 19,58%. Dari data ini dapat digambarkan bahwa senyawa antioksidan dalam tongkol jagung dipengaruhi oleh polaritas pelarut yang digunakan selama proses ekstraksi. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa aktivitas penangkal radikal bebas dalam ekstrak tongkol jagung secara umum berada pada pelarut semi polar (etil asetat dan butanol) daripada kurang polar (petroleum eter) dan sangat polar (air). Tomsone dkk. (2012) menyatakan bahwa perbedaan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH tergantung pada penggunaan pelarut dan matriks bahan pangan tersebut. Berdasarkan data literatur menunjukkan bahwa pelarut semi polar seperti etil asetat dan butanol memiliki kemampuan yang kuat sebagai penangkal radikal bebas daripada pelarut metanol, etanol, kloroform, petroleum eter dan heksana teknik (Aliyu dkk., 2011; Sutomo dkk., 2014; Moein dkk., 2015).

Aktivitas antioksidan yang diukur dengan metode radikal DPPH menunjukkan kecenderungan yang sama dengan kandungan total fenolik untuk fraksi etil asetat, fraksi butanol dan ekstrak etanol tetapi berbeda dengan fraksi petroleum eter dan fraksi air. Perbedaan ini membuktikan bahwa perolehan senyawa fenolik dari ekstrak tongkol jagung dipengaruhi oleh kelarutan senyawa fenolik dalam pelarut etil asetat dan butanol. Berdasarkan beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada hubungan yang kuat antara kandungan total fenolik dengan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dari ekstrak tanaman (Tomsone dkk., 2012; Alothman dkk., 2009; Yao dkk., 2010; Agbor dkk., 2005; Li dkk., 2009)

Komponen-komponen fenolik merupakan salah satu senyawa antioksidan yang termasuk kelompok asam fenolik dan flavonoid yang memiliki sifat-sifat aromatis dan mengandung gugus fungsi hidroksi sehingga memiliki kemampuan sebagai penangkal radikal bebas (Shahidi dan Naczk, 1995). Oleh karena itu, fraksi etil asetat menunjukkan kemampuan yang sangat kuat sebagai penangkal radikal bebas daripada keempat fraksi lainnya. Aktivitas fraksi etil asetat terhadap radikal bebas DPPH dibandingkan dengan α -tokoferol (vitamin E) sebagai kontrol positif pada konsentrasi yang sama memperlihatkan aktivitas penangkal radikal bebas tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan α -tokoferol ($p < 0,05$). Tetapi α -tokoferol menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas yang besar daripada fraksi butanol, fraksi petroleum eter dan fraksi air ($p < 0,05$).

Data ini membuktikan bahwa senyawa fenolik yang terkandung di dalam tongkol jagung memiliki kemampuan sebagai penangkal radikal bebas. Menurut Amic dkk. (2003) senyawa fenolik seperti flavonoid mengandung



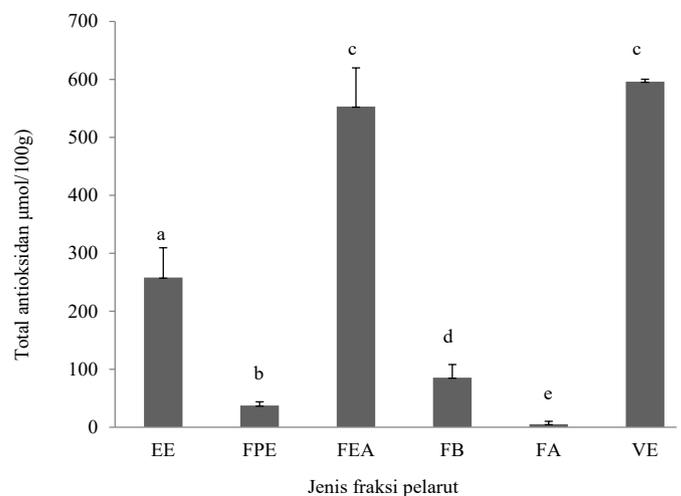
Gambar 1. Aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dari fraksi pelarut (EE: ekstrak etanol, FPE (fraksi petroleum eter), FEA (fraksi etil asetat), FB (fraksi butanol), FA (fraksi air) dan VE (α -tokoferol)

gugus hidroksil yang dapat mendonorkan atom hidrogen pada suatu radikal dan menjadikannya senyawa yang non radikal, sedangkan radikal fenolik yang terbentuk dapat terstabilkan secara resonansi pada cincin aromatik sehingga tidak reaktif, oleh karena itu senyawa fenolik dapat berfungsi sebagai antioksidan yang efektif.

Total Antioksidan Fraksi Pelarut

Pengujian dengan metode *ferric reducing ability of plasma* (FRAP) merupakan kemampuan antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} . Intensitas warna biru dari kompleks $Fe(III)$ -TPTZ (*ferric-2,4,6-tripirydil-s-triazine*) dapat diubah menjadi $Fe(II)$ -TPTZ (*ferrous-2,4,6-tripirydil-s-triazine*) pada pH rendah pada panjang gelombang 593 nm (Benzie dan Strain, 1996). Kandungan kapasitas total antioksidan pada ekstrak dan fraksi dari tongkol jagung dapat dilihat pada Gambar 2. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat (FEA) memiliki kapasitas total antioksidan lebih tinggi daripada ekstrak etanol (EE), fraksi butanol (FB), fraksi petroleum eter (FPE) dan fraksi air (FA) ($p < 0,05$). Total antioksidan yang rendah pada fraksi petroleum eter dan fraksi air berkaitan dengan rendahnya kontribusi senyawa fenolik dalam kedua fraksi tersebut daripada fraksi lain. Kandungan total fenolik tinggi menunjukkan tinggi pula kapasitas total antioksidan dan aktivitas penangkal radikal bebas dari ekstrak nenas, pisang dan jambu (Althoman dkk., 2009).

Total antioksidan yang tinggi pada FEA menunjukkan lebih banyaknya kandungan senyawa fenolik yang dapat mereduksi ion Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} daripada FB, EE, FPE dan FA. Senyawa pereduksi atau reduktor yang terdapat dalam fraksi tergolongkan dalam antioksidan fenolik alami. Oleh karena itu, kehadiran senyawa fenolik dalam ekstrak etanol dan fraksi pelarut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dan mampu berperan sebagai donor elektron yang selanjutnya menghakhiri reaksi rantai radikal dengan mengubah radikal bebas menjadi produk yang lebih stabil. Shahidi dan Nacz (1995) mengemukakan bahwa senyawa yang tergolong antioksidan alami dari golongan senyawa fenolik seperti senyawa fenolik sederhana, flavonoid dan tannin. Fraksi etil asetat tidak menunjukkan perbedaan kapasitas total antioksidan dengan α -tokoferol (vitamin E, VE) sebagai kontrol positif pada konsentrasi yang sama ($p < 0,05$). Tetapi VE menunjukkan total antioksidan lebih besar dibandingkan dengan fraksi butanol (FB), ekstrak etanol (EE), fraksi petroleum eter (FPE) dan fraksi air (FA). Hasil pengujian kapasitas total antioksidan dan penangkal radikal bebas DPPH menunjukkan kecendrungan yang sama untuk fraksi etil asetat, fraksi butanol, fraksi petroleum eter, fraksi air tetapi berbeda dengan ekstrak etanol. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode dengan pengujian FRAP dan



Gambar 2. Total antioksidan dari fraksi pelarut (EE: ekstrak etanol, FPE (fraksi petroleum eter), FEA (fraksi etil asetat), FB (fraksi butanol), FA (fraksi air) dan VC (vitamin C)

DPPH memiliki kecendrungan hasil yang sama dalam ekstrak tanaman pangan (Gill dkk., 2000; Althoman dkk., 2009).

Pemisahan Fraksi Etil Asetat dengan Kromatografi Kolom

Selanjutnya dari fraksi etil asetat (FEA) dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom dan subfraksi yang terisolasi diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm untuk senyawa fenolik (Wettasinghe dan Shahidi, 2000). Setiap subfraksi yang memiliki profil yang sama digabung menjadi satu puncak. Gambar 3 menunjukkan profil fraksi yang diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada λ 280 nm. Berdasarkan Gambar 4 diperoleh 6 fraksi, yaitu fraksi I antara nomor tabung 1 sampai 9, fraksi II antara nomor tabung 10 sampai 19, fraksi III antara nomor tabung 20 sampai 31, fraksi IV antara nomor tabung 32 sampai 36, fraksi V antara nomor tabung 37 sampai 40 dan fraksi VI antara nomor tabung 41 sampai 50. Hasil penimbangan fraksi dan sifat-sifatnya dapat dilihat pada Tabel 1. Berat total keenam fraksi adalah 647 mg (0,647 g), berarti ada 353 mg (0,353 g) fraksi etil asetat (FEA) yang masih tertahan dalam kolom silika gel.

Kandungan Total Fenolik Fraksi

Kandungan total fenolik dari fraksi I, II, III, IV, V dan VI dengan konsentrasi 1 mg/mL dapat dilihat pada Tabel 2. Fraksi I menunjukkan kandungan fenolik paling tinggi daripada fraksi V, II, IV, VI dan paling rendah terdapat pada fraksi III. Hasil penelitian ini memperlihatkan pada setiap fraksi memiliki kandungan total fenolik yang berbeda sehingga distribusi komponen aktif yang dapat berperan sebagai antioksidan dan antifotooksidan dalam fraksi

Tabel 1. Kelompok fraksi hasil fraksinasi ESHAE menggunakan kromatografi kolom dan sifat-sifat dan beratnya

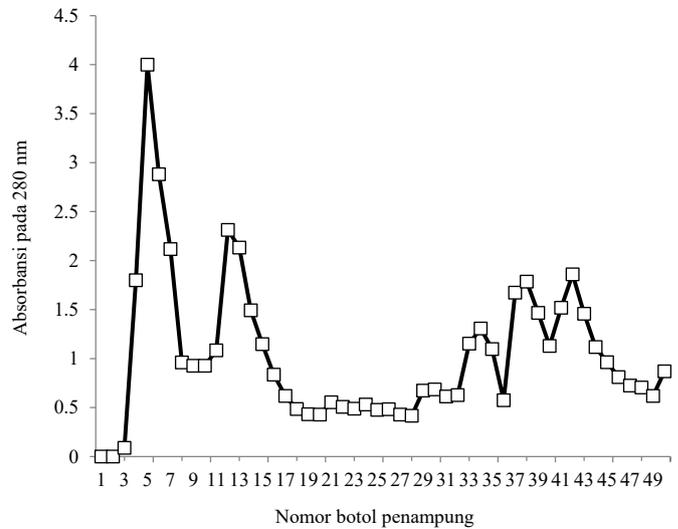
Nomor tabung	Kelompok fraksi	Warna	Bentuk	Berat (mg)
1-9	I	Coklat	kental	221
10-19	II	Jingga	serbuk	127
20-31	III	Kuning	kental	83
32-36	IV	Kuning	serbuk	54
37-40	V	Kuning	serbuk	61
41-50	VI	Kuning	serbuk	111

kemungkinan terdapat dalam satu fraksi dengan fraksi lain. Data ini memberikan gambaran bahwa setiap fraksi memiliki komponen aktif dan berpotensi sebagai antioksidan.

Aktivitas Antioksidan Fraksi-Fraksi

Aktivitas penangkal radikal bebas DPPH dari hasil pemisahan dengan kromatografi kolom pada konsentrasi 1 mg/mL dapat dilihat pada Tabel 2. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua fraksi memiliki aktivitas penangkal radikal bebas mencapai lebih dari 50%. Fraksi II dan fraksi III menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas yang paling kuat daripada fraksi V, I, IV dan VI. Hasil ini berarti bahwa senyawa fenolik dalam fraksi II dan fraksi III dan memiliki kemampuan untuk mendonorkan hidrogen kepada suatu radikal bebas dan kemungkinan kedua fraksi ini memiliki golongan senyawa fenolik atau flavonoid yang mirip. Berbeda dengan fraksi V yang memiliki kandungan total fenolik tertinggi daripada FII dan FIII tetapi kemampuannya dalam menangkal radikal bebas DPPH justru menunjukkan yang paling rendah, kemungkinan golongan senyawa fenolik atau flavonoid dalam fraksi ini kurang memiliki aktivitas antioksidan primer dibanding senyawa fenolik yang terdapat dalam FII dan FIII. Sebaliknya, pada fraksi III yang memiliki kandungan total fenolik yang paling rendah tetapi memiliki kemampuan untuk menangkal radikal bebas DPPH tidak menunjukkan perbedaan dengan fraksi II, hal ini disebabkan pada fraksi III terdapat senyawa lain selain golongan fenolik, flavonoid dan tannin yang mampu bersifat sinergis dengan senyawa fenolik lain sehingga memberikan kontribusi peningkatan aktivitas penangkal radikal bebas.

Kapasitas total antioksidan dari fraksi I, II, III, IV, V dan VI pada konsentrasi 1 mg/mL dilakukan dengan menggunakan metode FRAP. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan maka didapatkan hasil untuk kapasitas total antioksidan fraksi I, II, III, IV, V dan VI berturut-turut adalah 248,43; 305,41; 241,55; 227,81; 72,61; dan 125,30 µmol/100 g. Hasil kapasitas total antioksidan fraksi-fraksi



Gambar 3. Profil fraksi dari kromatografi kolom yang dibaca pada λ 280 nm

dapat dilihat pada Tabel 2. Berdasarkan Tabel 2, maka dapat dilihat bahwa fraksi II memiliki kapasitas total antioksidan yang paling tinggi dibandingkan dengan fraksi I, III, IV, V dan VI ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa fraksi II memiliki kapasitas antioksidan yang paling baik dan mampu mereduksi Fe^{3+} -(TPTZ) menjadi Fe^{2+} -(TPTZ). Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi II memiliki kapasitas total antioksidan yang paling tinggi, hal ini juga terlihat pada perbedaan intensitas warna biru yang ditimbulkan saat ekstrak etanol kasar, fraksi pelarut dan fraksi direaksikan dengan reagen FRAP, ketiga sampel tersebut memiliki warna biru pekat dibandingkan dengan sampel lain. Warna biru yang semakin pekat menghasilkan absorbansi yang lebih tinggi dan mengindikasikan bahwa kapasitas total antioksidan dalam sampel tersebut juga tinggi. Dari hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa kapasitas total antioksidan fraksi etil

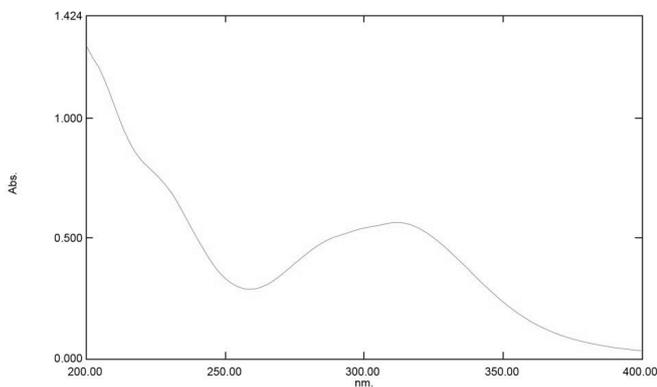
Tabel 2. Aktivitas antioksidan dari fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom

Fraksi	Total fenolik (µg/mL)	Penangkal radikal bebas (%)	Total antioksidan (µmol/100 g)
I	228,57 ± 0,12 ^a	81,19 ± 0,74 ^a	248,43 ± 0,07 ^a
II	127,14 ± 0,02 ^b	83,62 ± 0,49 ^b	305,41 ± 0,03 ^b
III	48,06 ± 0,01 ^c	83,28 ± 0,25 ^b	241,55 ± 0,06 ^c
IV	76,22 ± 0,07 ^d	80,92 ± 0,37 ^a	227,81 ± 0,03 ^d
V	170,92 ± 0,13 ^e	81,97 ± 0,62 ^a	72,61 ± 0,08 ^e
VI	68,57 ± 0,08 ^f	80,49 ± 0,49 ^c	125,30 ± 0,05 ^f

Keterangan:

Data dinyatakan dalam rata-rata ± SD dari 2 ulangan.

*Data dengan *superscript* huruf yang sama dalam satu kolom berarti tidak berbeda nyata ($p < 0,05$)



Gambar 4. Spektrum ultraviolet fraksi II

asetat lebih besar daripada fraksi II dan ekstrak etanol kasar. Hal ini disebabkan bahwa pada fraksi-fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom telah terdistribusi pada fraksi I, III, IV, V dan VI sehingga besar kecilnya kapasitas total antioksidan sangat dipengaruhi oleh senyawa-senyawa yang terkandung dalam masing-masing fraksi.

Spektrum Ultraviolet Fraksi II

Gambar 3 menggambarkan spektrum ultraviolet senyawa fenolik yang dipisahkan dengan kromatografi kolom dari fraksi II. Fraksi II menunjukkan absorbansi maksimum pada 285 dan 312 nm. Hasil pengukuran dengan spektra ultraviolet dari fraksi II menunjukkan bahwa pemisahan dengan campuran pelarut heksana dan etil asetat mampu mendapatkan senyawa fenolik. Ini dapat disebabkan kehadiran sejumlah besar senyawa golongan fenolik sederhana dan flavonoid yang sangat larut dalam campuran heksana-etil asetat (4:6).

Markham (1988) menyatakan bahwa golongan flavonoid memiliki puncak pita I pada panjang gelombang 300-330 nm dan pita II pada panjang gelombang 275-295 nm. Hasil analisis yang sama juga mengindikasikan adanya senyawa golongan asam fenolat yang didukung panjang gelombang antara 220 sampai 320 nm (Mabry dkk., 1970). Dey dan Harbone (1989) juga melaporkan bahwa campuran heksana dan etil asetat memisahkan golongan fenolik dan flavonoid menggunakan kromatografi kolom dengan sangat baik. Hal ini mungkin disebabkan kemampuan melarutnya sangat baik untuk golongan flavonoid dalam pelarut ini.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi etil asetat (FEA) memiliki kadar fenolik total, aktivitas penangkal radikal bebas dan kapasitas total antioksidan yang paling tinggi daripada fraksi butanol, ekstrak etanol, fraksi

air dan fraksi petroleum eter. Fraksi II menunjukkan aktivitas penangkal radikal bebas paling kuat diikuti dengan fraksi III, V, I, IV dan VI. Hasil ini juga menunjukkan bahwa fraksi II memiliki kapasitas total antioksidan paling tinggi daripada fraksi I, III, IV, VI dan V.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pimpinan Peningkatan Penelitian Perguruan Tinggi: Hibah Fundamental Tahun 2015. Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbor, G.A., Oben, J.E., Ngogang, J.Y., Xinxing, C. dan Vinson, J.A. (2005). Antioxidant capacity of some herbs/spices from Cameroon: a comparative study of two methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 6819-6824.
- Aliyu, A.B., Ibrahim, M.A., Musa, A.M., Bulus, T. dan Oyewale, A.O. (2011). Phenolics content and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Vernonia blumeoides* (Asteraceae). *International Journal of Biology Chemistry*. **5**: 352-350.
- Allothman, M., Bhat, R. dan Karim, A.A. (2009). Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chemistry*. **115**: 785-788.
- Ames, B.N. dan Shigenaga, M.K. (1993). *Oxidants are a major contributor in cancer and aging*. Dalam B. Haliwell and O.I. Aruoma (Eds). DNA and Free Radicals, Ellis Horwood Ltd., West Sussex, U.K.
- Amic, D., Beslo, D., Trinajstic, N. dan Davidovic (2003). Structure-radical scavenging activity relationship of flavonoids. *Croatia Chemica Acta*. **76**: 55-61.
- Benzie, I.F.F. dan Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochem* **239**: 70-76.
- Durling, N.E., Catchpole, O.J., Grey, J.B., Webby, R.F., Mitchell, C.A., Foo, L.Y. dan Perry, N.B. (2007). Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. *Food Chemistry* **101**: 1417-1424.
- Direktorat Jenderal Tanaman Pangan (2014). *Usaha Tani*:

- Statistik Pertanian*. Menteri Pertanian Republik Indonesia.
- Dey, P.M. dan Harbone, J.B. (1989). *Methods in plant biochemistry: Plant phenolics*. Academic Press, London.
- Gaulejac, N. S-C, Provost, C. dan Vivas, N. (1998). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 425-431.
- Gill, M.I., Tomas-Barberan, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. dan Kader, A.A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 4581-4589.
- Halliwell, B. dan Gutteridge, J.M.C. (2001). *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, London.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J. dan Aruoma, O.I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology* **33**: 601-617.
- Halliwell, B. dan Aruoma, O.I. (1997). Free radical and antioxidants: the need for *in vivo* markers of oxidative stress. *Dalam: Aruoma, O.I. dan S-L Cuppett. (eds.). Antioxidant Methodology: in Vivo and in Vitro Concepts*. AOCS Press, Champaign, Illinois.
- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C.W., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.B., Haffner, K., Baugerod, H., Andersen, L.F., Moskaug, O., Jacobs Jr. D.R. dan Blomhoff, R. (2002). A systematic screening of total antioxidant in dietary plants. *Journal of Nutrition* **132**: 461-471.
- Jeong, S.M., Kim, S.Y., Kim, D.R., Jo, S.C., Nam, K.C. Ahn, D.U. dan Lee, S.C. (2004). Effect of heat treatment on the antioxidant activity of extracts from citrus peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3389-3393.
- Li, X., Wu, X. dan Huang, L. (2009). Corelation between antioxidant activities and phenolic contents of *Radix Angelicae Sinensis* (Danggul). *Molecules* **14**: 5349-5361.
- Lorenz, K.J. dan Kulp, K. (1991). *Handbook of Cereal Science and Technology*. Marcel Dekker, New York.
- Lumempauw, L., Suryanto, E. dan Paendong, J. (2012a). Aktivitas anti UV-B ekstrak fenolik dari tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Jurnal MIPA* **1**: 1-4.
- Lumempauw, L., Suryanto, E. dan Paendong, J. (2012b). Aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol. *Chemistry Progress* **5**: 49-56.
- Maanari, C.P., Suryanto, E. dan Pontoh, J. (2014). Aktivitas penangkal radikal hidroksil fraksi flavonoid dari limbah tongkol jagung pada tikus Wistar. *Jurnal MIPA Unsrat* **3**: 134-138.
- Mabry, T.J., Markham, K.R. dan Thomas, M.B. (1970). *The Systematic Identification Of Flavonoid*. Springer Verlag, Berlin.
- Markham, K.R. (1988). *Cara Mengidentifikasi Flavonoida*. Terjemahan Padmawinata, K. ITB Press, Bandung.
- Meda, A., Lamien, C.E., Romito, M, Miliogo, J. dan Nacoulina, O.G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid, and proline contents in Burkina Fasan money, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry* **91**: 571-577.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **26**: 211-219.
- Moein, S., Moein, M. dan Farmani. (2015). Different methods evaluation of antioxidant properties of Myrtus communis extract and its fractions. *Trends in Pharmaceutical Sciences* **1**: 153-158.
- Naczki, M. dan Shahidi, F. (2006). Phenolic in cereals, fruit and vegetables: occurrence, extraction and analysis". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1523-1542**.
- Saleh, L.P., Suryanto, E. dan Yudistira, A. (2012). Aktivitas antioksidan dari ekstrak tongkol jagung. *Pharmacology* **3**: 20-24.
- Shahidi, F. dan Naczki, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publication Company, Inc., Lancaster.
- Suryanto, E., Momuat, L.I., Yudistira, A. dan Wehantouw, F. (2013). The evaluation of singlet oxygen quenching and sunscreen activity of corncob. *Indonesian Journal of Pharmacy* **24**: 274-283.
- Sutomo, Wahyuono, S., Setyowati, E.P., Rianto, S., Yusmanto, A. (2014). Aktivitas antioxidant and active fraction of kasturi fruit (*Mangifera casturi* Kosterm.) using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method. *Journal of Natural Products* **7**: 124-130.
- Tomsone, L., Kruma, Z. dan Galoburda, R. (2012). Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from Horseradish Roots (*Armoracia rusticana*). *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* **6**: 237-241.

- Yao, Y., Sang, W., Zhou, M. dan Ren, G. (2010). Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars. *Journal of Food Science*. **75**: C9-C13.
- Wettasinghe, M. dan Shahidi, F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*. **70**: 17-16.
- Wungkana, I., Suryanto, E. dan Momuat, L. (2013). Aktivitas antioksidan dan tabir surya fraksi fenolik dari limbah tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Pharmacon*. **2**: 149-155.