

Isolation, Characterization and Free Radical Activity of DPPH Secondary Metabolic Compounds from the Ethyl Acetate Fraction of Kokang Leaf (*Lepisanthes amoena* (Hassk) Leenh.)

Isolasi, Karakterisasi dan Aktifitas Radikal Bebas DPPH Senyawa Metabolit Sekunder dari Fraksi Etil Asetat Daun Kokang (*Lepisanthes amoena* (Hassk) Leenh.)

Hadi Kuncoro^{*1}, Diana Kurnia Apriani¹, Nisa Naspiah¹, Agung Rahmadani²

¹Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian FARMAKA TROPIS, Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur 75119

²Prodi Pendidikan Kimia, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur 75119

Email: hadikuncoro@farmasi.unmul.ac.id

ABSTRACT

Kokang (*L. amoena* (Hassk) Leenh.) is a local plant from East Kalimantan and is used as an alternative treatment by the Dayak tribe to treat various skin problems, including removing black spots on the face, healing smallpox scars, acne scars and skin care. . This study aims to obtain isolates of secondary metabolites that have antioxidant activity and to determine the chemical structure of these isolates. The method used is maceration extraction with methanol. The extract was fractionated with n-hexane, ethyl acetate and n-butanol. The ethyl acetate fraction was isolated using various chromatographic techniques. Free radical activity assay uses a qualitative method with DPPH. Isolation results obtained isolate EA31 which has antioxidant activity. The results of the elucidation of the structure of the isolates were based on MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR. obtained a compound with the molecular formula C₁₅H₁₂O₁₁ which gives the activity against free radical DPPH.

Keywords: Isolation, Kokang (*Lepisanthes amoena* (Hassk) Leenh.), DPPH.

ABSTRAK

Kokang (*L. amoena* (Hassk) Leenh.) merupakan tanaman lokal Kalimantan Timur dan digunakan sebagai alternatif pengobatan oleh suku dayak untuk mengatasi berbagai masalah kulit, diantaranya menghilangkan noda hitam di wajah, menyembuhkan bekas luka cacar, bekas jerawat dan perawatan kulit (skincare). Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antioksidan dan mengetahui struktur kimia dari isolat tersebut. Metode yang digunakan adalah ekstraksi secara maserasi dengan metanol. Ekstrak difraksinasi dengan n-heksan, etil asetat dan n-butanol. Fraksi etil asetat diisolasi dengan menggunakan berbagai teknik kromatografi. Pengujian antioksidan menggunakan metode kualitatif dengan DPPH. Hasil isolasi didapatkan isolat EA31 yang memiliki aktivitas antioksidan. Hasil elusidasi struktur isolat berdasarkan MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR. diperoleh senyawa dengan rumus molekul C₁₅H₁₂O₁₁ yang memberikan aktifitas terdapat radikal bebas DPPH.

Kata kunci: Isolasi, Kokang (*Lepisanthes amoena* (Hassk) Leenh.), DPPH.

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki beraneka ragam tanaman yang berkhasiat sebagai obat. 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 (Isnindar et al, 2011). Salah satu contoh tumbuhan yang mengandung senyawa obat yaitu tanaman Kokang (*L. ameona* (Hassk) Leenh).

Banyaknya sumber radikal bebas mengakibatkan munculnya berbagai macam penyakit yang berbahaya, seperti penyakit kanker, penyakit yang berhubungan dengan kardiovaskular, dan penyakit degeneratif. (Barhe dan Tehouya, 2014). Oleh karena itu diperlukan suatu senyawa antioksidan yang mampu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas tersebut, dimana antioksidan itu sendiri dapat merendam dampak negatif dari radikal tersebut (Winarsi, 2011).

Kokang (*L. amoena* (Hassk) Leenh) merupakan salah satu tanaman endemik di Kalimantan Timur yang digunakan secara empiris sebagai pembersih tubuh dan wajah oleh masyarakat suku Dayak dan Kutai sebagai pengganti fungsi sabun mandi, hal ini dikarenakan daun kokang mengeluarkan busa seperti sabun. Tanaman ini juga digunakan untuk perawatan kulit (skin care) dalam mengatasi berbagai masalah kulit diantaranya, menghilangkan noda hitam diwajah, menyembuhkan bekas luka cacar dan bekas jerawat dengan cara mengambil pucuk daunnya, lalu dipilin hingga berbusa, kemudian dijadikan sebagai pencuci muka, buahnya dapat pula dikonsumsi (Pramana dkk, 2013). Daun kokang juga diolah menjadi bedak dingin (pupur) untuk melindungi diri dari sinar matahari pada saat berladang (Husnul, 2017). Selain bagian daun, bagian buah dari tanaman kokang ini memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC50 pada pericarp 53,21 ppm, biji 63,30 ppm dan flesh 122,51 ppm (Heriad dkk, 2017) sedangkan dari hasil pengujian pada bagian daun menunjukkan aktifitas antiradikal bebas terhadap DPPH secara kuantitatif terhadap ekstrak daun kokang dengan pelarut etanol 96%, 70%, n-heksana, dan etil asetat memperoleh nilai IC50 berturut-turut 6.8171, 24.7343, 10.0184, dan 5.0107 ppm (Fajriyanti et al, 2021).

Berdasarkan penelitian sebelumnya yaitu menurut Husnul (2017), ekstrak daun kokang memiliki potensi sebagai tabir surya, pada konsentrasi 400 ppm memiliki nilai SPF 15 yang termasuk kategori medium protection dan pada konsentrasi 700 ppm memiliki nilai SPF 50 yang termasuk kategori very high protection. Menurut Henny (2015), ekstrak daun kokang dapat berpotensi sebagai obat luka dengan konsentrasi 5%, 7,5% dan 10% dengan lama penyembuhan luka sekitar 13-15 hari. Menurut Warnida, (2016) ekstrak daun kokang pada konsentrasi 6%, 12% dan 24% dapat menghambat pertumbuhan bakteri staphylococcus apidermis sebagai penyebab jerawat dan masing-masing konsentrasi dapat menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 1,75 mm, 2,16 mm dan 2,25 mm.

Penelitian terkait yang pernah dilakukan oleh Agus Pramana (2013) yaitu isolasi dan karakterisasi senyawa steroid pada fraksi n-heksana dari daun kokang. Hasil pada penelitian tersebut menunjukkan senyawa steroid hasil isolasi dari fraksi n-heksana dari daun kokang dapat diisolasi melalui proses maserasi, dilanjutkan dengan proses fraksinasi, lalu dilakukan proses pemisahan dan pemurnian melalui proses kromatografi kolom. Hasil karakterisasi yang didapatkan menggunakan spektrofotometri inframerah menunjukkan adanya gugus : hidroksil (OH), alkil, C-O alkohol sekunder dan alkena (C=C) tak terkonjugasi sehingga diduga senyawa metabolit sekunder pada fraksi n-heksana dari daun kokang merupakan senyawa steroid golongan sterol. Daun kokang merupakan salah satu tanaman yang mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder, berdasarkan penelitian Husnul (2017) dan Heriad (2017) daun dan buah tanaman kokang mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin triterpenoid dan tanin..

Berdasarkan uraian diatas, maka peneliti ingin meneliti mengenai isolasi senyawa pada tanaman kokang yang berasal dari Kalimantan Timur yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Bagian yang digunakan yaitu daun kokang. Penelitian mengenai isolasi daun kokang belum banyak dilakukan di Indonesia. Selain itu, belum ada penelitian yang dilakukan untuk mengetahui struktur senyawa yang terkandung pada daun kokang. Sehingga peneliti ingin meneliti senyawa yang terkandung dalam isolat fraksi etil asetat pada daun kokang.

ALAT DAN BAHAN

Alat dan Bahan

Kolom Gravitasi, *vaccum rotary evaporator* (Buchi), Lampu UV 254 dan 366, NMR (JEOL) Mass spectra (Waters, QToF HR-MS XEVOtm *mass spectrometer* (Waters, Milford, MA, USA). ¹H dan ¹³C NMR JEOL NMR A-500 MHz menggunakan tetramethylsilan (TMS) sebagai internal standart (JEOL, Tokyo, Japan). Silica gel 60 (Merck, Darmstadt, Germany), Plat TLC Silika Gel GF₂₅₄ (Merck). n-heksana, Etil asetat, Etanol (Tecnichal Grade), H₂SO₄ (Merck).

Bahan Tumbuhan

Bahan yang diteliti adalah daun Kokang (*Lepisanthes amoena* (Hassk) Leenh.). Pengambilan bahan daun kokang diperoleh dari Kabupaten Kutai Barat, Kalimantan Timur. Bagian tumbuhan yang diambil dan diteliti adalah daun yang masih segar diambil secara random (acak). Daun kokang yang diperoleh dilakukan determinasi oleh staff Laboratorium Dendrologi dan Ekologi Hutan Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman.

Metode

1. Persiapan Sampel

Sampel berupa daun kokang segar 1000 Gram dikeringkan menjadi simplisia melalui beberapa tahapan yaitu pengumpulan bahan, sortasi basah, pencucian, pengeringan, sortasi kering, dan diserbukkan. Hasil akhir tahapan tersebut yaitu berupa serbuk simplisia daun kokang.

2. Ekstraksi Sampel

250 Gram Serbuk Simplisia daun kokang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol sehingga diperoleh bagian residu dan bagian ekstrak daun kokang. Ekstrak daun kokang kemudian dipekatkan dengan *Vaccum Rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak metanol daun kokang.

3. Fraksinasi

Fraksinasi dengan menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Ekstrak daun kokang ditimbang kemudian dilarutkan dengan aquades (1:2), kemudian di partisi dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan n-butanol hingga tuntas. Hasil fraksi yang diperoleh kemudian dipekatkan lalu ditimbang.

4. Isolasi Metabolit sekunder

Fraksi etil asetat kering dilakukan pemisahan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan eluen terbaik. Fraksi etil asetat kemudian diisolasi dengan metode kromatografi kolom (KK). Hasil pemisahan ditotolkan pada plat KLT lalu dielusi. Fraksi yang memiliki penampakan noda yang sama digabungkan. Fraksi hasil pemisahan menggunakan kromatografi kolom dilanjutkan dengan pemisahan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) untuk mendapatkan spot tunggal pada noda, kemudian diuji dengan KLT untuk melihat kemurnian suatu senyawa, selanjutnya dilakukan karakterisasi struktur kimia hasil isolasi dengan menggunakan spektroskopi MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR.

5. Analisis Karakterisasi Senyawa (MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR)

Senyawa Hasil isolasi dari fraksi etil asetat daun kokang dengan melihat geseran kimia pada hasil spectra NMR dan mengetahui massa molekul dari senyawa berdasarkan data MS.

6. Pengujian Kualitatif Aktivitas Antiradikal DPPH

Pengujian aktivitas antiradikal terhadap DPPH dilakukan dengan metode DPPH. Metode yang digunakan adalah metode kualitatif dengan menyemprotkan DPPH 100 ppm pada plat KLT yang telah dielusi sampel. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi kuning cerah setelah proses penyemprotan DPPH pada noda yang terdapat pada plat KLT tersebut.

Analisis Data

Data analisis penelitian ini dilaporkan secara deskriptif yang meliputi data hasil rendemen dan fraksi yang dihasilkan, menjabarkan teknik isolasi pada fraksi etil asetat daun kokang, eluen yang

dapat memberikan pemisahan yang terbaik, aktivitas antioksidan dan menjabarkan elusidasi struktur berdasarkan hasil analisis data MS dan NMR.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Kokang

Proses ekstraksi daun kokang dengan cara simplisia dihaluskan terlebih dahulu. Fungsi penghalusan simplisia adalah untuk mengecilkan ukuran partikel dari simplisia agar dapat kontak dengan pelarut sehingga banyak senyawa metabolit sekunder yang dapat tertarik. Kemudian dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan pelarut metanol sambil diaduk hingga seluruh simplisia terbasahi merata dengan pelarut. Perendaman dilakukan dengan pelarut metanol, sesekali dilakukan pengadukkan dengan tujuan untuk meningkatkan kelarutan agar seluruh permukaan simplisia dapat kontak dengan pelarut sehingga dapat terekstraksi secara optimal. Kemudian larutan disaring, maserat yang didapatkan dipekatkan dengan *vaccum rotary evaporator*, kemudian diulangi prosedur remaserasi hingga proses ekstraksi tuntas.

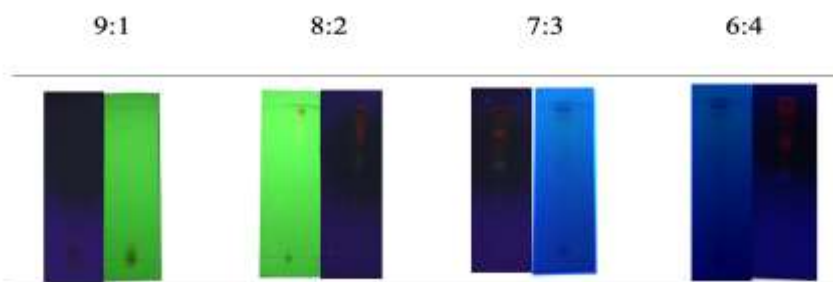
Metode ekstraksi yang dipilih dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Pemilihan metode bertujuan untuk mengurangi dan menjaga agar kandungan senyawa yang terdapat dalam sampel tidak rusak akibat pemanasan dan dapat mengekstraksi sampel dalam jumlah yang banyak. Penggunaan pelarut metanol, dimana pelarut metanol memiliki tingkat kepolaran yang tinggi sehingga mampu menarik semua senyawa yang bersifat non-polar dan polar yang terdapat dalam sampel. Hal tersebut menunjukkan bahwa metode ekstraksi secara maserasi dengan pelarut metanol menghasilkan rendemen yang banyak dari daun kokang.

Ekstrak yang diperoleh dari proses ekstraksi selanjutnya dilakukan proses fraksinasi dengan metode fraksinasi cair-cair berdasarkan tingkat kepolaran pelarut, ekstrak metanol pekat dilarutkan dalam air (1:50) dan dipartisi berturut-turut dengan n-heksan, etil asetat dan n-butanol. Hasil fraksinasi kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol dengan nilai rendemen berturut-turut 10%, 30% dan 20% terhadap ekstrak. Berdasarkan hasil tersebut, menunjukkan bahwa nilai rendemen terbesar hasil fraksinasi yaitu pada rendemen fraksi etil asetat. Semakin besar nilai rendemen menandakan semakin banyaknya jumlah kandungan senyawa yang dapat terekstraksi oleh pelarut. Besarnya nilai rendemen fraksi etil asetat menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang bersifat semi polar cukup banyak dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan fraksi n-butanol. Sehingga fraksi yang dilanjutkan untuk diisolasi lebih lanjut yaitu fraksi etil asetat.

Proses isolasi daun kokang dilakukan menggunakan berbagai teknik kromatografi. Fraksi etil asetat dilakukan analisis pola noda terlebih dahulu dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk menentukan eluen yang terbaik sehingga dapat dilanjutkan ke tahap pemisahan selanjutnya. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa yang ditandai dengan munculnya noda yang tidak berekor dan jarak antara noda yang muncul sangat jelas. Eluen yang digunakan dalam memisahkan senyawa pada fraksi etil asetat daun kokang menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan n-heksan:etil asetat (6:4, 7:3, 8:2 dan 9:1). Pemilihan eluen berdasarkan dengan pemisahan noda dan banyaknya noda yang terdapat pada KLT. Berdasarkan Gambar 1 diketahui bahwa eluen yang dapat memberikan pemisahan dengan baik yaitu eluen n-heksan:etil asetat (7:3) dengan jumlah noda 4. Pada eluen 6:4 dan 8:2 noda berekor dan pemisahan yang kurang jelas, sedangkan pada eluen n-heksan:etil asetat (9:1) noda yang ditotolkan tidak mengalami pemisahan. Sehingga berdasarkan hasil tersebut, eluen yang akan digunakan sebagai acuan dalam proses isolasi pada fraksi etil asetat daun kokang yaitu n-heksan:etil asetat (7:3).

Pemisahan pada fraksi etil asetat daun kokang dilakukan menggunakan kromatografi kolom menggunakan silika gel 60 (0,063-0,200 nm) sebagai fase diam dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3). Teknik elusi yang digunakan isokratik, yaitu selama proses elusi menggunakan fase gerak dengan polaritas yang tetap. Hasil kolom ditampung pada vial yang telah dikalibrasi 10 mL. Berdasarkan hasil pemisahan yang diperoleh didapatkan 60 vial yang kemudian dipantau pemisahan

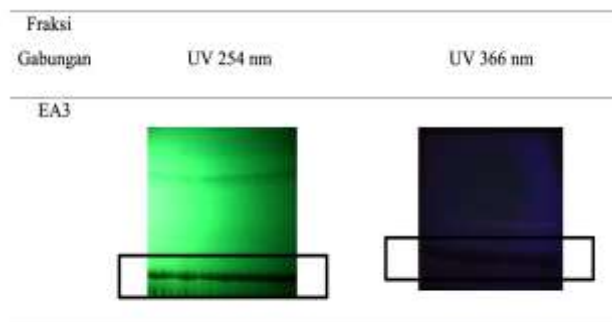
pola nodanya dengan menggunakan KLT dan eluen n-heksan:etil asetat dengan perbandingan 7:3, kemudian diamati pola noda dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Vial digabungkan berdasarkan pemisahan pola noda yang sama menjadi satu kelompok. Berdasarkan pemisahan pola noda didapatkan 18 subfraksi gabungan yaitu EA1, EA2, EA3, EA4, EA5, EA6, EA7, EA8, EA9, EA10, EA11, EA12, EA13, EA14, EA15, EA16, EA17 dan EA18. Pada subfraksi EA3 dilanjutkan pemisahan selanjutnya, hal ini dikarenakan pada subfraksi EA3 terdapat 3 pola noda dengan pemisahan yang baik. Pada subfraksi EA3 dilakukan pemantauan pola noda untuk mengetahui eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik pada subfraksi EA3. Eluen yang menghasilkan pola pemisahan yang baik yaitu n-heksan:kloroform (1:1) . Subfraksi EA3 dilanjutkan pemisahannya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) menggunakan eluen n-heksan:kloroform (1:1) seperti yang terlihat pada gambar 3. Berdasarkan pemurnian yang dilakukan setelah diamati pada UV 254 nm dan 366 nm terdapat 3 pola noda yang berbeda. Pada ketiga pola noda tersebut dilakukan pemisahan dan dilarutkan dengan n-heksan:kloroform dengan tujuan menarik senyawa yang terdapat pada silika. Setelah dilakukan proses pemurnian isolat EA3 kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan Plat KLT GF₂₅₄ dengan eluen n-heksan:kloroform dan diamati dibawah Lampu UV 254 dan 366 nm yang terlihat pada Gambar 4, menunjukkan satu spot noda sehingga diperoleh isolat EA31.



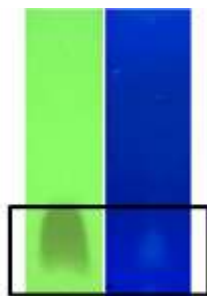
Gambar 1. Profil KLT Penentuan Eluen Fraksi Etil Asetat dengan KLT Silika Gel GF₂₅₄ menggunakan eluen n-heksana: Etil asetat dalam berbagai perbandingan menggunakan lampu UV 254 dan 366 nm.



Gambar 2. Profil KLT Silika Gel GF₂₅₄ fraksi isolat hasil kolom V.36 pada lampu UV 254 nm



Gambar 3. Proses pemurnian KLT preparatif fraksi gabungan EA3

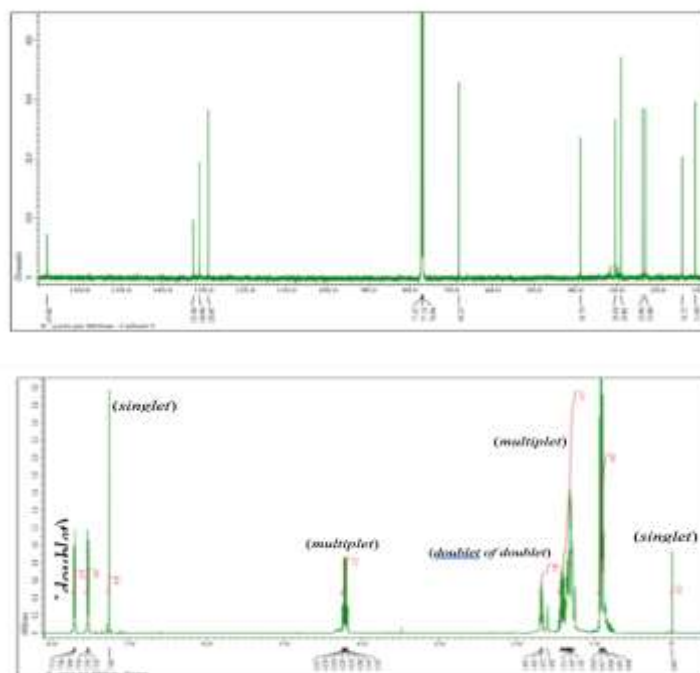


Gambar 4. Uji kemurnian isolat hasil KLTP dengan KLT Silika Gel GF₂₅₄ dengan eluen n-heksana:kloroform (1:1)

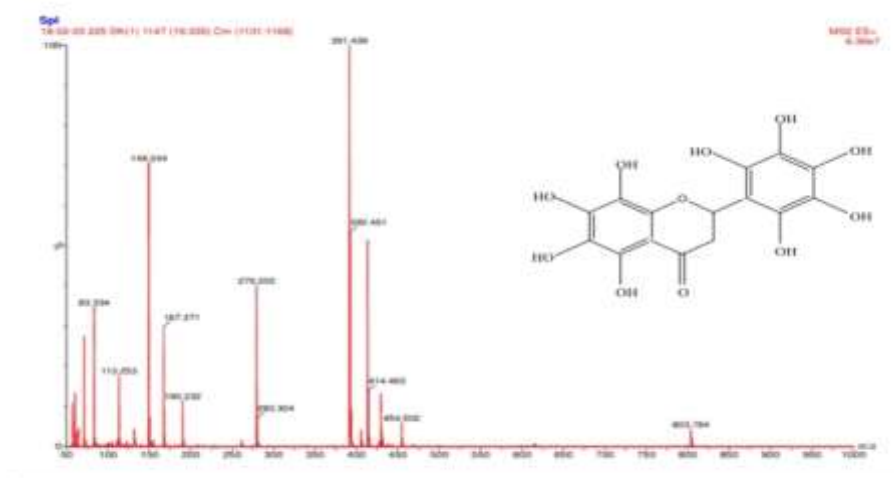
Pada subfraksi EA3 dilanjutkan pemisahan selanjutnya, hal ini dikarenakan pada subfraksi EA3 terdapat 3 pola noda dengan pemisahan yang baik. Pada subfraksi EA3 dilakukan pemantauan pola noda untuk mengetahui eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik pada subfraksi EA3. Eluen yang menghasilkan pola pemisahan yang baik yaitu n-heksan:kloroform (1:1). Subfraksi EA3 dilanjutkan pemisahannya dengan menggunakan kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP) menggunakan eluen n-heksan:kloroform (1:1) seperti yang terlihat pada gambar 3. Berdasarkan pemurnian yang dilakukan setelah diamati pada UV 254 nm dan 366 nm terdapat 3 pola noda yang berbeda. Pada ketiga pola noda tersebut dilakukan pemisahan dengan cara dikerok dan dilarutkan dengan n-heksan:kloroform dengan tujuan menarik senyawa yang terdapat pada silika. Setelah dilakukan proses pemurnian isolat EA3 kemudian dilakukan uji kemurnian dengan menggunakan KLT eluen n-heksan:kloroform dan diamati dibawah sinar UV 254 dan 366 nm yang terlihat pada Gambar 4, menunjukkan satu spot noda sehingga diperoleh isolat EA31.

Karakterisasi dengan menggunakan spektrum ¹³C-NMR dari isolat EA31 pada Gambar 5 menunjukkan bahwa terdapat pergeseran kimia 77.11 ppm yang menunjukkan adanya tipe karbon C=C. Pergeseran kimia pada 167.8 ppm yang menunjukkan adanya atom C pada karboksilat (C=O), dimana range pergeseran kimia pada pergeseran kimia 155-185 ppm yaitu karboksilat. Pada pergeseran kimia 128.8 ppm menunjukkan adanya C pada C-H aromatik dengan range pergeseran 110-155 ppm. Pergeseran kimia 23.08-38.77 ppm dengan range 20-45 ppm menunjukkan C pada CH₂.

Karakterisasi dengan menggunakan spektroskopi massa bertujuan untuk mengetahui massa molekul relatif senyawa hasil isolasi. Berdasarkan data MS tersebut, dapat diketahui bahwa senyawa yang terdapat pada sampel EA31 memiliki massa molekul sebesar 391 [M+Na]⁺ yang diduga memiliki rumus C₁₅H₁₂O₁₁. Terdapat penambahan ion Na⁺ pada saat preparasi sampel sebelum dianalisis dengan menggunakan instrumen ESI, penggunaan spektroskopi massa ESI senyawa akan diubah ke dalam bentuk spray agar molekul menjadi lebih kecil. Molekul yang terbentuk merupakan molekul dengan muatan netral, sehingga pada hasil analisis massa molekul yang diperoleh terdapat penambahan Ar 23 dari Na⁺ menjadi 391. ESI (Electrospray Ionization) merupakan salah satu metode ionisasi dalam spektroskopi massa yang digunakan untuk mendapatkan ion molekul dengan prinsip penyemprotan aerosol sehingga diperoleh ion molekul (Capiello, 2007). Pada detektor akan menangkap molekul yang bermuatan baik negatif ataupun positif sehingga perlu dilakukan penambahan ion pseudo seperti [M+H]⁺, [M+K]⁺ dan [M+Na]⁺. (Eichhorn dan Knepper, 2001). Hasil karakterisasi senyawa isolat menggunakan MS, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR dapat dilihat pada Gambar 5 dan hasil karakterisasi senyawa isolat menggunakan MS dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 5. Spektrum hasil ¹H-NMR dan ¹³C-NMR



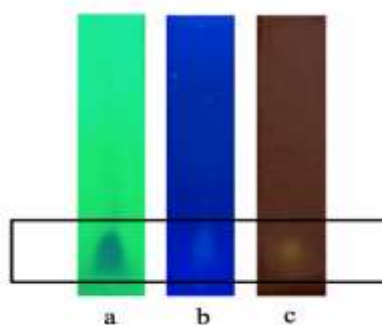
Gambar 6. Spektrum MS

Pengujian aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). Antioksidan merupakan senyawa organik yang dapat meredam radikal bebas dalam tubuh manusia dengan proses oksidasi. Radikal bebas merupakan suatu molekul yang relatif tidak stabil dengan atom yang pada orbit terluarnya memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan (Robins, 2007). DPPH menerima elektron atau radikal hidrogen akan membentuk molekul diamagnetik yang stabil. Interaksi antioksidan dengan DPPH baik secara transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. (Cholisoh, 2008). Metode DPPH merupakan salah satu contoh senyawa radikal bebas yang akan mengambil atom hidrogen yang terdapat dalam suatu senyawa. Larutan DPPH berwarna ungu, larutan DPPH

akan mengoksidasi senyawa dalam tanaman. Proses ini ditandai dengan memudarnya warna larutan dari ungu menjadi warna kuning (Prakasih, 2001).

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu senyawa antioksidan yang terdapat pada isolat EA31. Uji kualitatif antioksidan dilakukan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan menyemprotkan DPPH. Sebelum disemprotkan dengan DPPH isolat EA31 ditotolkan pada lempeng lalu dielusi dengan eluen n-heksan:etil asetat (7:3). Setelah dielusi diamati penampakan noda pada UV 254 dan 366 nm. Setelah itu disemprotkan dengan larutan DPPH 100 ppm dengan melarutkan 4,5 mg DPPH dalam 100 mL etanol.

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Gambar 7, diketahui bahwa isolat EA31 memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang ditunjukkan dengan memudarnya warna DPPH. Pemudaran warna DPPH menandakan terjadinya pengikatan satu elektron atom N (nitrogen) pada DPPH sehingga membentuk diphenylpicrylhydrazyl yang stabil.



- Keterangan :
- a. Diamati pada UV 254 nm
 - b. Diamati pada UV 366 nm
 - c. Setelah di semprot DPPH 100 ppm (positif memiliki aktivitas antioksidan)
- Gambar 7. Pengujian Aktivitas Antioksidan dari Isolat EA31

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi isolat dari fraksi etil asetat daun kokang diperoleh satu isolat dengan rumus molekul $C_{15}H_{12}O_{11}$ yang memiliki aktifitas terhadap Radikal bebas DPPH secara kualitatif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Yoshihito Shiono dari *Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan* untuk pengujian NMR.

DAFTAR PUSTAKA

- Barhe, TA and Tehoiya, G.R., 2014, Comparative Study of the Anti-oxidant Activity of the Total Polyphenols Extracted from Hibiscus Sabdariffa L., Glycine max L. Merr., Yellow Tea and Red Wine through Reaction with DPPH Free Radical, *Arabian Journal of Chemistry*,9, 1-8.
- Capiello, A. 2007. Advance and LC-MS Instrumentation. *Jornal of Chromatography Library*, 72, 1-5
- Cholisoh, Z. 2008. Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Etanol 70% Biji Jengkol (Archidendron jiringa). *Jurnal Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta*.

- Eichhorn, P. and Knepper, P. T. 2001. Electrospray Ionization Mass Spectrometric Studies on the Amphoteric Surfactant Cocamidoprylbetaine. *Journal of Mass Spectrometry*, 36, 677-684
- Fajriyati, S. A. N. ., Arifuddin, M. ., & Kuncoro, H. . (2021). Uji Antioksidan Daun Kokang (*Lepisanthes amoena*) dengan Metode DPPH. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*, 13(1), 182–187. <https://doi.org/10.25026/mpc.v13i1.464>
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung.
- Heriad Daud S, 2017. *Phytochemical Screening and Antioxidant Activity of Selekop (Lepisanthes amoena) Fruit*. Faculty of Forestry Mulawarman University Samarinda East Kalimantan Indonesia.
- Herawati, D, Nuraida L, dan Sumarto. 2012. *Cara Produksi Simplisia yang Baik*. Bogor: Seafast Center
- Husnul. 2017. *Efektivitas Ekstrak Daun Kokang (Lepishantes amoena) Sebagai Tabir Surya ; Eksplorasi Kearifan Lokal Kalimantan Timur*. Akademi Farmasi Samarinda.
- Isnindar, Subagus Wahyuono, Erna Prawita Setyowati. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional*. 16 (3). 157 – 164.
- Jusmiati, A., Rolan Rusli, Laode Rijai. 2015. Aktivitas Antioksidan Buah Kakao Masak dan Kulit Buah Kakao Muda. *Journal Sains dan Kesehatan*. 1 (1). 34-39
- Kumar Vinay, Abbas Abul K, Fausto Nelson, Mitchell Richard N, 2007, *Robbins Basic Pathology*, 8th Edition, Philadelphia, USA, Saunders Elsevier, Chapter 19 The Female Genital System and Breast: 724-725
- Lambert, J.B. and Mazzola, E.P. 2004. *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: an Introduction on Principles, Applications, and Experimental Methods*, Pearson Education.
- Mathias, O., Hamburger and Geoffrey A. Cordell. 1987. A Direct Bioautographic Assay for Compounds Possessing Antibacterial Activity. *Journal of Natural Products*. Vol. 50. No. 1. 19-22.
- Nurkhasanah, Trisnamurti, K. C., Gunaryanti, R. D. and Widyastuti, T., 2015, The Screening of Cytotoxic Fraction from *Elephantopus scaber* Linn against Human Cervical Cancer (Hela) Cells, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6(6): 1011–1014.
- Prakasih, A. Rigelhof F dan Miller F. 2001. Antioxidant Activity. *Medallion Laboratories Analytical Progress*. 19 (2). 1-4
- Pratimasari, D. 2009. “Uji Aktivitas Penangkap Radikal Buah Carica Papaya L. Dengan Metode DPPH dan Penetapan Kadar Fenolik Serta Flavonoid Totalnya”. Skripsi. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Redha, Abdi. 2010. Flavonoid : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian* 9 (2)

Reynertson, K. A., 2007, *Phytochemical Analysis of Bioactive Constituents from Edible Myrtaceae Fruit*, Dissertation, The City University of New York, New York

Riza, 2013. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Steroid Pada Fraksi N-Heksana dari Daun Kokang*. Jurnal Kimia Mulawarman Volume 10 Nomor 2. Kimia FMIPA Unmul.

Rohman, A. dan Riyanto S. 2007. *Daya Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kemuning (Murraya paniculata (L) Jack.) secara in Vitro*. Majalah Farmasi Indonesia, 16 (3). 136-140.

Sunarni, T., Suwidjiyo Pramono dan Ratna Asmah, 2007. *Flavonoid Antioksidan Penangkap Radikal dari Daun Kepel Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Eter Hasil Hidrolisis Infusa*. (Agustina Ardianti) (*Stelechocarpus burahol* (B1.) Hook f.& Th.).

Stahl, Egon. 1967. *Dunnschicht-Cromatographie*. Eie Laboratorium Shandouch. Berlin : Zweite Auflage.