

**UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN KOMBINASI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) DAN DAUN JAMBU BIJI (*Psidium guajava* L.)
DENGAN METODE DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)**

Iman Bagus Wicaksono, Maria Ulfah*

Fakultas Farmasi, Universitas Wahid Hasyim

Jl. Menoreh Tengah X/22, Sampangan, Semarang, 50236

*Email : mariaul_astra@yahoo.com

Abstrak

Radikal bebas dapat menjadi penyebab penyakit degeneratif. Antioksidan dapat menghambat radikal bebas. Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) telah diketahui manfaatnya sebagai antioksidan yang baik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak etanol daun Sirsak dan ekstrak etanol daun Jambu Biji terhadap radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Penarikan senyawa-senyawa aktif dari daun Sirsak dan daun Jambu Biji dilakukan dengan proses ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Kombinasi ekstrak etanol daun Sirsak dan daun Jambu Biji dibuat dengan perbandingan (1:0) (0:1) (1:1) (1:2) dan (2:1) dengan konsentrasi 20; 40; 60; 80 dan 100 µg/mL diuji aktivitas antioksidannya dengan metode DPPH secara spektrofotometri Vis, hingga diperoleh nilai IC_{50} . Hasil Penelitian menunjukkan bahwa nilai IC_{50} untuk ekstrak daun Sirsak (1:0) sebesar 28,251 µg/mL, nilai IC_{50} ekstrak daun Jambu Biji (0:1) sebesar 6,933 µg/mL, nilai ekstrak kombinasi (1:1) sebesar 12,979 µg/mL, nilai IC_{50} ekstrak kombinasi (1:2) sebesar 9,009 µg/mL, dan nilai IC_{50} ekstrak kombinasi (2:1) sebesar 13,996 µg/mL. Hasil uji beda menunjukkan kombinasi ekstrak etanol daun Sirsak dan daun Jambu Biji meningkatkan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun Sirsak namun akan menurunkan aktivitas antioksidan ekstrak daun Jambu biji secara signifikan pada kombinasi (2:1).

Kata kunci: ekstrak etanol daun Sirsak, ekstrak etanol daun jambu Biji, metode DPPH, IC_{50} .

PENDAHULUAN

Penyakit degeneratif seperti kanker, atherosclerosis, neurodegeneratif, dan inflamasi terjadi karena adanya induksi dari radikal bebas. Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang sifatnya sangat tidak stabil dan reaktif dimana elektron pada orbital terluarnya tidak memiliki pasangan sehingga akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya yang akan mengakibatkan kerusakan sel dan gangguan metabolisme. Antioksidan adalah substansi yang mampu menangkal atau meredam radikal bebas dan mencegah terjadinya kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas (Winarsi, 2007).

Tanaman merupakan salah satu sumber antioksidan alami, oleh karena itu perlu digali terus menerus penelitiannya untuk mendapatkan sumber antioksidan potensial. Beberapa sumber tanaman yang telah diuji aktivitas antioksidannya adalah daun Sirsak dan daun Jambu Biji. Daun Sirsak dikenal masyarakat sebagai antikanker, antitumor, antimikroba, antiparasit, antihipertensi, pengobatan sakit pinggang dan bisul. Sedangkan daun Jambu Biji dikenal masyarakat sebagai antidiare,

pengobatan sakit maag, sariawan, keputihan, perut kembung pada anak, sakit kulit, diabetes dan besar atau sering buang air kecil (Latief, 2012). Aktivitas antioksidan daun Sirsak telah dibuktikan oleh Baskar *et al.*, (2006) dengan nilai IC_{50} sebesar 70 µg/mL. Sedangkan aktivitas antioksidan daun Jambu Biji telah dibuktikan oleh Vyas *et al.*, (2010) dengan nilai IC_{50} sebesar 45 µg/mL.

Kombinasi dari dua atau lebih jenis antioksidan dimungkinkan dapat menghasilkan potensi aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (Lingga, 2012). Beberapa penelitian antioksidan dengan mengkombinasi tanaman telah dilakukan untuk meningkatkan potensi antioksidan seperti temu ireng, temu lawak, temu giring dan kunyit (Simanjuntak dkk., 2008). Sarang semut dan teh hitam (Utomo dkk., 2011), kulit Manggis, daun Sirsak dan daun Sirih Merah (Saraswati dkk., 2013). Oleh karena itu dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan kombinasi ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) sebagai antioksidan ditinjau dari kapasitas peredaman radikal bebas pada dua

ekstrak tersebut dengan berbagai seri konsentrasi secara tunggal dibandingkan dengan seri konsentrasi secara kombinasi kedua ekstrak terhadap DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) secara spektrofotometri visibel.

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan:

Bahan tanaman yang digunakan adalah daun Sirsak dan daun Jambu Biji yang diperoleh dari Desa Pasigitan Rt 1/ Rw 7, Kec. Boja, Kab. Kendal, Jawa Tengah. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) pro analisis, Vitamin C (asam askorbat) pro analisis, etanol 70%.

Alat:

Timbangan elektrik (Ohaus), seperangkat alat maserasi, *rotary evaporator* (Heidolph), oven (Mettler), alat *moisture balance* (Ohaus), alat-alat gelas, *yellow/blue tip*, *micropipette* (Socorex), *stirrer*, dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu).

Prosedur Penelitian:

Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun Sirsak dan Daun Jambu Biji sebanyak masing-masing 3 kg dicuci dengan air mengalir, kemudian diangin-anginkan dan disortasi basah. Proses pengeringan dengan oven pada suhu 45°C sampai kering. Simplisia kering yang didapat kemudian disortasi kering. Simplisia kering ditimbang dan dibuat serbuk dengan cara diblender kemudian diayak dengan ayakan ukuran 25 mesh serta diukur kadar airnya dengan *moisture balance*.

Pembuatan Ekstrak

Masing-masing serbuk simplisia ditimbang 500 gram dimasukkan dalam toples yang berbeda, ditambah cairan penyari yaitu etanol 70% sebanyak 3,5 L, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk sehari minimal 3 kali. Setelah 5 hari, campuran simplisia dan etanol 70% diserkai sehingga diperoleh filtrat (maserat) I. Ampas ditambah etanol 70% sebanyak 1,5 L kemudian ditutup dan dibiarkan selama 5 hari, terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari, campuran ampas dan etanol 70% diserkai kembali dan diperoleh filtrat (maserat) II. Filtrat I dan II kemudian dicampur dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C sampai diperoleh ekstrak kental etanol. Alat *rotary evaporator* sebaiknya dibersihkan

terlebih dahulu sebelum digunakan untuk memekatkan maserat dari simplisia yang berbeda. Hitung rendemen setelah didapatkan ekstrak etanol masing-masing simplisia dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak yang didapat}}{\text{berat serbuk yang diekstraksi}} \times 100\% (1)$$

Uji Aktivitas Antioksidan

Ditimbang sejumlah ekstrak kental daun Sirsak dan ditambahkan ekstrak daun Jambu Biji dengan perbandingan (1:0) (1:1) (2:1) (1:2) (0:1). Kombinasi ekstrak tersebut dilarutkan dalam etanol p.a hingga diperoleh konsentrasi 1000 µg/mL, dari larutan tersebut dibuat deret konsentrasi 20; 40; 60; 80 dan 100 µg/mL direaksikan dengan 4 mL larutan DPPH 0,0001 M dan 50 µL larutan uji, kemudian divortex selama 1 menit dan didiamkan 10 menit (OT). Absorbansi dibaca pada panjang 516,6 nm. Dilakukan pula pembacaan absorbansi larutan kontrol DPPH 0,0001 M.

Analisis Data

Pada penelitian ini, data yang dikumpulkan berupa persentase aktivitas antioksidan yang dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{aktivitas antioksidan} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\% (2)$$

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan melalui perhitungan nilai IC_{50} yang ditentukan menggunakan analisis probit menggunakan program SPSS versi 20 antara konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase aktivitas antioksidan (y). Kemudian di regresi linier antara log konsentrasi (x) dengan nilai probit yang diperoleh (y) didapatkan nilai IC_{50} . Perbedaan seri kombinasi dan konsentrasi pada masing-masing sampel diuji terhadap persentase aktivitas antioksidan dari masing-masing perlakuan. Apabila data nilai persentase aktivitas antioksidan memenuhi syarat normalitas dan homogenitas, kemaknaan perbedaan persentase aktivitas antioksidan tiap perlakuan diuji analisis statistik Anova *two way* dengan taraf kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan Serbuk Simplisia

Hasil sortasi daun didapat daun Sirsak 2,5 kg dan daun Jambu Biji 2,7 kg. Pengeringan masing-masing dilakukan pada suhu 45°C dalam oven hingga didapat kadar air simplisia

kurang dari 10%. Daun Sirsak dan daun Jambu Biji diukur kadar air didapat 6,3% dan 5,9%. Kadar air lebih dari 10% akan menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme pada simplisia yang akan digunakan, karena air merupakan media pertumbuhan bagi mikroorganisme dan juga berperan sebagai media terjadinya reaksi enzimatis yang mampu menguraikan senyawa aktif dari simplisia (Depkes RI, 1995). Hasil pengeringan didapat bobot simplisia kering daun Sirsak sebanyak 0,755 kg dan Daun Jambu Biji sebanyak 0,910 kg. Simplisia kering tersebut diserbuk dan diayak didapat serbuk simplisia daun Sirsak sebanyak 0,870 kg dan daun Jambu Biji 0,740 kg. Simplisia diserbuk dengan tujuan memperluas permukaan simplisia, sehingga akan mempermudah cairan penyari untuk melarutkan zat aktif yang terkandung di dalam simplisia tersebut (Voight, 1994).

Pembuatan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol pada penelitian ini dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini digunakan karena memiliki keuntungan dapat menarik zat aktif yang tidak tahan panas, mudah dilakukan, dan alat yang digunakan sederhana. Penyari yang digunakan adalah etanol 70% teknis. Pemilihan etanol sebagai penyari karena pelarut etanol tidak beracun, jamur dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% keatas, mampu menarik zat aktif flavonoid, antrakinon, glikosida, alkaloid basa, kumarin, tanin, dan saponin. Etanol juga memiliki beberapa keuntungan diantaranya yaitu tidak beracun, bersifat netral, dapat bercampur dengan air, memiliki titik didih yang rendah, dan menetralkan enzim-enzim yang dapat merusak metabolit sekunder (Depkes, 1986). Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kasar (*crude extract*) berupa pasta.

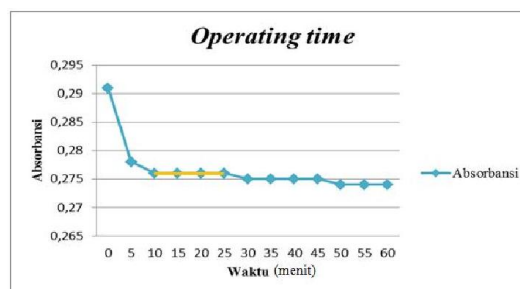
Ekstrak kental Daun Sirsak yang diperoleh sebanyak 58,6346 gram dengan rendemen sebesar 11,73% dan ekstrak kental Daun Jambu Biji sebanyak 76,3183 gram dengan rendemen 15,26%. Ekstrak disimpan dalam wadah yang bersih, kering dan terhindar dari cahaya untuk menjaga mutu dan menghindari kerusakan. Pembuatan ekstrak kental bertujuan untuk menghilangkan pelarut sehingga diharapkan ekstrak yang didapat hanya berisi komponen zat aktif yang berasal

dari simplisia tanpa adanya pengaruh pelarut yang digunakan (Voight, 1994).

Uji Aktivitas Antioksidan

Penentuan panjang gelombang (λ) maksimum dilakukan untuk mengukur absorbansi senyawa DPPH pada daerah visibel sehingga diperoleh serapan yang maksimum. Blanko yang digunakan yaitu etanol p.a bertujuan untuk faktor koreksi. DPPH dapat diukur intensitas warnanya pada λ 515-520 nm (Molyneux, 2004). Panjang gelombang (λ) maksimum yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 516,6 nm.

Penentuan *operating time* perlu dilakukan untuk menentukan waktu sempurna reaksi yang ditunjukkan dengan tidak adanya lagi penurunan absorbansi. Waktu pengukuran dihitung sejak dicampurnya larutan DPPH dengan vitamin C (Molyneux, 2004). Absorbansi stabil dari larutan DPPH dengan vitamin C pada penelitian ini terjadi pada menit ke-10. Grafik penentuan *Operating time* dapat dilihat pada gambar 1:

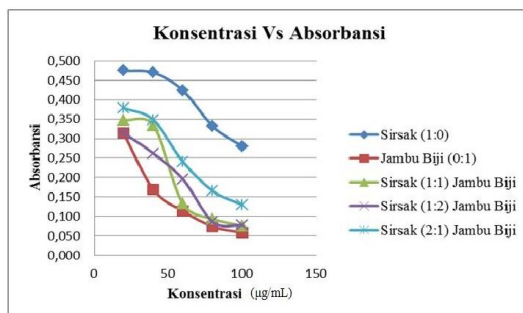


Gambar 1. Hasil Penentuan *Operating Time* (OT)

Pengujian aktivitas antioksidan secara spektrofotometri dengan DPPH memiliki beberapa kelebihan diantaranya yaitu cepat, murah, mudah, sederhana, butuh sedikit sampel dan peka (Molyneux, 2004). Metode DPPH adalah salah satu uji kuantitatif untuk mengetahui seberapa besar aktivitas kombinasi ekstrak daun Sirsak dan ekstrak daun Jambu Biji sebagai antioksidan. Uji aktivitas antioksidan DPPH berdasarkan reaksi penangkapan radikal DPPH oleh senyawa antioksidan melalui mekanisme donasi atom hidrogen sehingga akan dihasilkan DPPH non radikal dan menyebabkan terjadinya penurunan intensitas warna ungu dari DPPH (Windono dkk., 2004).

Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini karena merupakan salah satu sumber antioksidan yang mudah diperoleh, banyak dikonsumsi masyarakat, aktivitas antioksidannya tinggi dan sangat kuat (Sandhiutami dan Dwi, 2010). Fungsi kontrol positif adalah sebagai pembanding apakah zat uji bisa berefek sama dengan sumber antioksidan standar yang digunakan sebagai kontrol positif.

Intensitas peredaman warna ungu dari DPPH dapat dilihat dari nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer. Untuk mengetahui tingkat peredaman warna sebagai akibat adanya senyawa antioksidan yang mampu mengurangi intensitas warna ungu dari DPPH, maka pengukuran reaksi warna dilakukan pada konsentrasi ekstrak yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan semakin besar pula peredamannya yang ditandai dengan terbentuknya warna kuning. Penurunan intensitas warna sebanding dengan jumlah senyawa DPPH yang dapat diredam oleh senyawa antioksidan, hal ini akan membuat nilai absorbansinya semakin kecil. Semakin kecil nilai absorbansinya menunjukkan kapasitas antioksidan yang semakin besar (Molyneux, 2004). Menurut hukum *Lambert-Beer*, ada korelasi sebanding antara konsentrasi dengan nilai absorbansi. Grafik absorbansi sampel dengan berbagai konsentrasi dari masing-masing seri kombinasi dapat dilihat pada gambar 2:



Gambar 2. Grafik absorbansi sampel

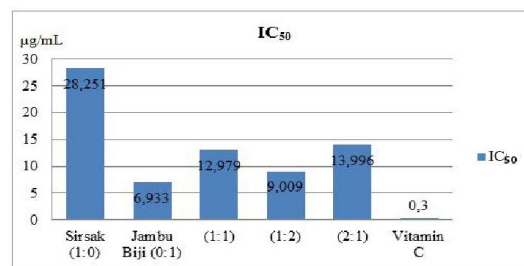
Besar absorbansi kontrol yang didapat adalah 0,940 dan dihitung dengan besar absorbansi sampel. Hasil perhitungan persentase aktivitas antioksidan dari ekstrak Daun Sirsak, Daun Jambu Biji dapat dilihat pada tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Persentase Aktivitas Antioksidan Sampel

Konsentrasi (µg/mL)	Aktivitas Antioksidan (%)				
	Daun Sirsak	Daun Jambu Biji	Kombinasi		
			(1:1)	(1:2)	(2:1)
20	49,468	66,596	62,979	66,489	59,681
40	50,000	82,021	64,468	72,128	62,979
60	54,894	87,872	85,851	79,149	74,362
80	64,681	92,128	90,000	90,851	82,340
100	70,106	93,723	91,915	91,809	86,170

Data % aktivitas antioksidan yang diperoleh diuji Anova *two way* dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan program SPSS Versi 20 menunjukkan ada perbedaan aktivitas antioksidan yang bermakna pada seri kombinasi (1:0) dengan (1:1) (1:2) (2:1) yang dapat diartikan bahwa kombinasi ini meningkatkan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol Daun Sirsak. Perbandingan seri kombinasi (0:1) menunjukkan ada perbedaan bermakna dengan seri kombinasi (2:1) yang dapat diartikan aktivitas antioksidan pada seri perbandingan (2:1) lebih rendah bila dibanding senyawa tunggal ekstrak etanol Jambu Biji.

Nilai IC_{50} didapat dari persamaan regresi linier yang diperoleh dari log konsentrasi larutan uji (x) dengan nilai probit (y). Nilai probit diperoleh dari analisis probit menggunakan program SPSS Versi 20 antara konsentrasi larutan uji (x) dan persentase aktivitas antioksidan (y). Nilai IC_{50} berbanding terbalik dengan kemampuan antioksidan suatu senyawa yang terkandung dalam bahan uji. Semakin kecil nilai IC_{50} semakin besar kemampuan aktivitas antioksidannya. Nilai IC_{50} dapat dilihat pada gambar 3 berikut:



Gambar 3. Nilai IC_{50} Seri Kombinasi Sampel dan Kontrol Positif

Nilai IC_{50} pada masing-masing kombinasi ekstrak Daun Sirsak dan Daun

Jambu Biji, diperoleh pada perbandingan (1:0) yaitu sebesar 28,251 $\mu\text{g/mL}$, perbandingan (0:1) sebesar 6,933 $\mu\text{g/mL}$, perbandingan (1:1) sebesar 12,979 $\mu\text{g/mL}$, perbandingan (1:2) sebesar 9,009 $\mu\text{g/mL}$ perbandingan (2:1) sebesar 13,996 $\mu\text{g/mL}$ dan kontrol positif pada vitamin C sebesar 0,300 $\mu\text{g/mL}$. Artinya pada konsentrasi tersebut larutan uji dapat meredam DPPH sebesar 50%. Menurut Blois (1958) aktivitas antioksidan dari semua seri perbandingan kombinasi tersebut sangatlah kuat karena memiliki IC_{50} kurang dari 50 $\mu\text{g/mL}$.

KESIMPULAN

1. Kombinasi ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} perbandingan (1:1) sebesar 12,979 $\mu\text{g/mL}$, (1:2) sebesar 9,009 $\mu\text{g/mL}$ dan (2:1) sebesar 13,996 $\mu\text{g/mL}$.
2. Aktivitas Antioksidan ekstrak etanol daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) (0:1) lebih baik dibandingkan kombinasi (1:1) (1:2) (2:1) dan ekstrak etanol daun Sirsak (*Annona muricata* L.) (1:0).
3. Seri kombinasi (1:2) ekstrak etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L.) memiliki aktivitas antioksidan paling baik dengan nilai IC_{50} sebesar 9,009 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Baskar, R., Rjeswari, V., and Kumar, S.T., (2006), Antioxidant Studis in Leaves of *Annona* Species, *Departemen of Biotechnology Coimbatore*, 45, 480-485.
- Blois, M.S., (1958), Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199-1200.
- Depkes RI., (1986), *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1-10.
- Depkes RI., (1995), *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, xxii, 47.
- Latief, A., (2012), *Obat Tradisional*, Penerbit Buku Kedokteran, Surabaya. 81-83, 243-245.
- Lingga, L., (2012), *The Healing Power of Anti-oxidant*, Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Molyneux, P., (2004), The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 26 (2), 211-219.
- Sandhiutami dan Dwi, N.M., (2010), Uji Aktivitas Antioksidan Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Secara In Vitro dan In Vivo pada Tikus yang diberi Beban Aktivitas Fisik Maksimal, *Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi*, 15 (1), 1-5.
- Saraswati, V., Risdian, C., Budiwati, T.A., dan M. Tjandrawati, (2013), Aktivitas Antioksidan dari Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Manggis, Daun Sirsak, dan Daun Sirih Merah, *Pusat Penelitian LIPI*, Bandung.
- Simanjutak, P., Rachman, F., Logawa, E.D., dan Hegartika, A., (2008), Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tunggul dan Kombinasinya Dari Tanaman Curcuma sp, *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 6 (2), 69-74.
- Utomo, A.B., Supriyono, A., dan Risdianto, A., (2011), Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendans*) & Ekstrak Teh Hitam (*Cornellia sinensis* O.K.var.assamica (mast.)) dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *Skripsi*, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Yayasan Pharmasi, Semarang.
- Voight, R., (1994), *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh Soendani Noerono Soewandhi, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, pp. 561.
- Vyas, N., Tailang, M., and Gavatia, N.P., (2010), Antioxidant Potential of *Psidium guajava* Linn, *International Journal of Pharmatech Research*, 28, 417-419.
- Winarsi, H., (2007), *Antioksidan Alami & Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta, 12-15, 77-80, 185.
- Windono, T., dkk. (2004). Studi Hubungan Struktur-Aktivitas Kapasitas Peredaman Radikal Bebas Senyawa Flavonoid terhadap 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH). *Artocarpus* 4 (1) : 42-52.