

THE ACTIVITY OF RADICAL SCAVENGING OF 2,2-DIPHENYL-1-PYCRILHYDRAZIL (DPPH) BY ETHANOLIC EXTRACTS OF MENKUDU LEAVES (*Morinda citrifolia* L.), BROTOWALI STEM (*Tinospora crispa* L.), ITS WATER FRACTION AND ITS HYDROLIZED FRACTION

AKTIVITAS PENANGKAPAN RADIKAL 2-2' DIFENIL-1-PIKRIL HIDRAZIL (DPPH) EKSTRAK ETANOLIK DAUN MENKUDU (*Morinda citrifolia* L.), DAN BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* L.), FRAKSI AIR SERTA FRAKSI AIR TERHIDROLISIS

Tatang Irianti *, Andayana Puspitasari, Machwiyyah L., Rabbani HR
Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

We have investigated the antiradical activity of ethanolic extract of mengkudu leaves (*Morinda citrifolia* L.) and brotowali stem (*Tinospora crispa* L.) using radical scavenging assay or DPPH radical. Thin layer chromatograms were also studied to estimate the group of compounds that have antiradical activity. The objective of this research was to compare the DPPH antiradical efficiency values of water fraction and acid hydrolyzed water fraction in both extracts. The radical scavenging IC_{50} value of ethanolic extract, water fraction, and hydrolyzed water fraction (one and three hours) of mengkudu leaves were 75,65 $\mu\text{g/mL}$; 98,68 $\mu\text{g/mL}$; 36,27 $\mu\text{g/mL}$ and 33,36 $\mu\text{g/mL}$ respectively. The IC_{50} value for brotowali stem were 33.75 $\mu\text{g/mL}$, 52.29 $\mu\text{g/mL}$, 31.12 $\mu\text{g/mL}$ and 18.26 $\mu\text{g/mL}$. The highest antiradical activity was the hydrolyzed water fraction three hour namely 200 $\mu\text{g/mL}$ of this fraction was able to inhibit 33.12% and 18.26 $\mu\text{g/mL}$ DPPH radicals.

Key words: radical scavenging, *Morinda citrifolia* L., *Tinospora crispa*, L., hydrolyzed water fraction, DPPH

ABSTRAK

Keberadaan radikal bebas dalam tubuh dapat menimbulkan beberapa kerusakan atau penyakit, sehingga antioksidan tambahan bisa sebagai salah satu penangkalnya. Penelitian ini membandingkan aktivitas penangkapan radikal 2-2' difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH) ekstrak etanolik, fraksi air, dan fraksi air terhidrolisis pada daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) serta batang brotowali (*Tinospora crispa*, L.). Penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yakni ekstraksi, fraksinasi untuk mendapatkan fraksi air, perlakuan hidrolisis asam pada fraksi air (satu dan 3 jam), uji aktivitas antioksidan dengan kromatografi lapis tipis dan uji penangkapan radikal DPPH dengan spektrofotometri. Senyawa antioksidan pada masing-masing fraksi dan aktivitas penangkapan radikal DPPH (%) dapat diketahui dari profil kromatogram, sedangkan IC_{50} dapat dihitung dari kurva linier antara konsentrasi vs aktivitas penangkapan radikal (%). Nilai IC_{50} sebelum dan sesudah hidrolisis dibandingkan dengan uji paired sample t-test pada SPSS 16.0 dengan taraf signifikansi 95%. Nilai IC_{50} ekstrak etanolik, fraksi air, fraksi air dengan perlakuan hidrolisis asam selama 1 jam, dan fraksi air dengan perlakuan hidrolisis asam selama 3 jam berturut-turut sebesar 75,65 $\mu\text{g/mL}$, 98,68 $\mu\text{g/mL}$, 36,27 $\mu\text{g/mL}$ dan 33,36 $\mu\text{g/mL}$ pada daun mengkudu. Sedangkan pada batang brotowali nilainya 33,75 $\mu\text{g/mL}$, 52,29 $\mu\text{g/mL}$, 31,12 $\mu\text{g/mL}$ dan 18,26 $\mu\text{g/mL}$. Proses hidrolisis dapat mengubah profil fitokimia fraksi air dan meningkatkan aktivitas penangkapan radikalnya.

Kata kunci: Daun mengkudu, Batang brotowali, Radikal 2,2' Difenil-1- Pikril Hidrazil, fraksi air terhidrolisis.

PENDAHULUAN

Daun mengkudu dan batang brotowali berpotensi sebagai sumber antioksidan alami berasal dari tanaman obat. Beberapa ekstrak non air daun mengkudu mempunyai nilai IC_{50} sebesar

0,20-0,35mg/mL dan fraksi etil asetat dibanding fraksi air pada batang brotowali mempunyai aktivitas antioksidan lebih tinggi (Thani dkk., 2010 dan Irianti dkk., 2011). Selain itu infusa daun mengkudu juga dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding infusa teh hijau (West dan Zhou, 2008, West dkk.,2009). Salah satu senyawa bertanggung jawab sebagai

Corresponding author : Tatang Irianti
Email : intanti@ugm.ac.id

antioksidan adalah flavonoid. Amom dkk. (2009) melaporkan kandungan flavonoid dalam batang brotowali adalah katekin, luteolin, morin dan rutin.

Fraksinasi digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya, Irianti dkk., (2012) menunjukkan bahwa fraksi air mempunyai aktivitas antioksidan lebih rendah dibanding fraksi etil asetat. Fraksi air (fraksi tidak larut etil asetat) mengandung banyak glikosida flavonoid yang mempunyai aktivitas penangkapan radikal DPPH (Sang dkk., 2001). Kandungan flavonoid dalam bentuk glikosida lebih banyak dibandingkan aglikon flavonoid dalam daun mengkudu (Deng dkk., 2008). Glikosida flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibandingkan bentuk aglikonnya (Heim dkk., 2002). Kuersetin sebagai aglikon menunjukkan kapasitas antioksidan intraseluler yang lebih tinggi bila dibandingkan bentuk glikosidanya (Kim dan Jang, 2010).

Dengan membebaskan aglikon dari bentuk glikosida diharapkan dapat meningkatkan aktivitas antioksidan fraksi air. Pembebasan aglikon ini dapat dilakukan dengan cara hidrolisis dalam kondisi asam (Harborne, 1965). Kim dan Jang (2010) juga menyatakan bahwa secara in vitro kemampuan penangkapan radikal hidroksil dan peroksi radikal ekstrak daun Mulberry meningkat setelah perlakuan hidrolisis. Teh yang dihidrolisis dengan bantuan enzim tannase dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan in vitro lebih tinggi dibandingkan sebelum hidrolisis. Hal ini dikonfirmasi dengan menggunakan uji DPPH dan sistem ORAC (Macedo, dkk., 2011).

Pitchaon (2011) meneliti membebaskan flavonoid dengan hidrolisis asam meningkatkan aktivitas antioksidan secara signifikan dengan metode ABTS, DPPH pada ekstrak biji Mangga (*Mangifera indica* Linn.). Penelitian lain yang dilakukan oleh Wang, dkk (2002) pada *Anoectochilus formosanus* Hayata (Orchidaceae) menyatakan bahwa prosedur hidrolisis asam dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas antioksidan ekstrak yang diuji. Oleh sebab itu, Wang, dkk.,(2002) menawarkan prosedur hidrolisis sebagai prosedur rutin untuk mengevaluasi kekuatan antioksidan dari berbagai ekstrak tanaman. Aktivitas antioksidan dievaluasi dengan menggunakan metode penangkapan radikal DPPH yang diekspresikan dengan nilai IC₅₀.

Metode DPPH merupakan metode yang sederhana dan hanya membutuhkan spektrofotometer UV-Vis. Adanya hidrogen/elektron donor (antioksidan penangkap radikal) membuat intensitas absorpsi menurun dan

larutan radikal kehilangan warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang berhasil ditangkap (Molyneux, 2004). Metode DPPH direkomendasikan sebagai metode yang mudah dan akurat untuk mengukur aktivitas antioksidan ekstrak. Hasil uji lebih reproduibel bila dibandingkan metode penangkapan radikal bebas yang lain seperti 2,2'-azonobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic-acid) atau ABTS (Sharma and Bhat, 2009). Kinetika reaksi antara fenol-ABTS ditemukan berbeda dengan fenol-DPPH pada rentang konsentrasi yang mirip. Radikal DPPH banyak digunakan saat ini karena stabilitasnya yang tinggi, bahan uji yang diperlukan kecil dan dapat diaplikasikan untuk senyawa lipofilik maupun hidrofilik (Deng dkk., 2011). Metode penangkapan radikal DPPH memiliki kelebihan antara lain pereaksi tidak selektif sehingga senyawa dengan gugus fungsi dari antioksidan lemahpun dapat diidentifikasi dan waktu stabil setelah terjadi reaksi cukup memadai untuk di analisis. Metode DPPH dapat digunakan pada solven organik berair maupun nonpolar, maka antioksidan hidrofilik maupun lipofilik dapat diuji aktifitasnya (Deng, dkk., 2011).

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan batang brotowali (*Tinospora crispa* L.). Daun mengkudu (M) diperoleh dari Jitardukuh, Sumberarum, Moyudan, Sleman, Yogyakarta dan batang brotowali (B) dipanen dari Purwosari, Sinduadi, Mlati, Sleman. Pelarut dalam penelitian ini ada yang kualitas teknis seperti etanol 96%, heksan, etil asetat, dan kualitas dari pro analisis (Merck) seperti methanol, etanol, heksan, etil asetat, kuersetin (Sigma aldrich), 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), penampak bercak AlCl₃, aquadest, HCl 2 N (Laboratorium Fitokimia Bagian Biologi Farmasi UGM).

Ekstraksi dan partisi

Sebanyak masing-masing 10 kg daun mengkudu segar dan batang brotowali bagian tengah 1-1,5 meter (m) dari 2 m, disortasi kemudian dicuci dengan air mengalir. Selanjutnya daun dan batang dikeringkan dengan oven suhu 500C selama 10 jam sampai kering patah dengan sebelumnya ditiriskan untuk menghilangkan air menempel. Dua macam serbuk dimaserasi dengan etanol 96% (teknis) dan dilakukan pengadukan secara berulang. Filtrat sari etanol diuapkan hingga didapat ekstrak kental. Sebanyak 7,5 gram masing-masing ekstrak etanol ini ditambahkan

pelarut 25mL 70% etanol sampai tercampur sempurna. Ekstrak dipartisi cair-cair dengan 50 mL heksan menggunakan corong Buchner, partisi dilakukan berturut-turut sehingga didapat fase heksan jernih (bagian atas). Fase heksan dan fase tidak larut heksan diuapkan hingga kental. Fase tidak larut heksan dilarutkan dalam aquadest kemudian dipartisi cair-cair dengan 50mL etil asetat menggunakan corong Buchner, partisi dilakukan sehingga didapatkan fase etil asetat jernih (bagian atas). Fase etil asetat dan fase air diuapkan sampai kental.

Hidrolisis fraksi air

Metode hidrolisis asam pada fraksi air merupakan gabungan dan modifikasi berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Harborne (1965) dan Wang dkk (2002). Sebanyak 5 gram sampel dari fraksi air (fase padat tak larut etil asetat) dilarutkan dalam 50mL larutan dari etanol 96% dan 25mL HCl 2 N (etanol-HCl 2N 1:1, v/v) dimasukkan dalam labu alas bulat dan di refluks selama 60 menit dan 180 menit. Larutan hasil refluks didiamkan sampai dingin pada suhu kamar, kemudian dipartisi cair cair berulang dengan air/ etil asetat (1:1, v/v). Fraksi air terhidrolisis asam didapat dari fraksi etil asetat jernih serta tidak berwarna, selanjutnya disaring menggunakan natrium sulfat anhidrat untuk menghilangkan tapak air. Fraksi etil asetat diuapkan tanpa pemanasan sampai kental.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis digunakan untuk melihat profil kromatogram ekstrak etanolik dan masing-masing fraksi. Fase diam yang digunakan adalah silika gel 60 F₂₅₄ dengan fase gerak etil asetat: diklormetan: asam formiat: asam asetat: aquades (100:25:10:10:11) dan kloroform:methanol:asam formiat (44:3,5:2,5 v/v) dengan jarak pengembangan 8 cm. Plat dilihat dibawah sinar tampak, UV 254, dan UV 366 (Wang dkk, 2009).

Pembanding yang digunakan pada metode KLT ini kuersetin. Fase diam silika gel F₂₅₄ dan fase gerak masing-masing ekstrak dengan jarak pengembangan 8 cm. Plat dilihat di UV 254, UV 366, kemudian disemprot dengan AlCl₃ untuk mendeteksi golongan flavonoid. Golongan senyawa yang ada pada ekstrak etanolik, fraksi air dan fraksi hasil hidrolisis ditotolkan pada lempeng KLT. Setelah dielusi, bercak diamati pada UV254 nm, UV366 nm dan sinar tampak. Untuk uji pendahuluan senyawa antioksidan, lempeng KLT disemprot dengan 0,2% DPPH. Untuk mendeteksi senyawa golongan flavonoid di digunakan penampak bercak AlCl₃.

Pada sampel fraksi dengan hidrolisis selama 1 jam, 3 jam dan standar kuersetin diidentifikasi dengan KLT menggunakan fase diam silika gel 60 F₂₅₄. Sedangkan fase geraknya adalah toluen: etil asetat: metanol: asam format (32:14:12:5 v/v) dan kloroform:methanol:asam formiat (44:3,5:2,5 v/v). Setelah dielusi, bercak diamati pada UV 254 nm, UV 366 nm dan sinar tampak serta untuk mendeteksi senyawa golongan flavonoid digunakan penampak bercak AlCl₃.

Aktivitas penangkapan radikal dengan metode DPPH

Metode uji penangkapan radikal didasarkan pada metode yang dilakukan oleh Scherer dan Godoy (2009) dan Deng dkk (2011). Sebanyak 3,9mL larutan DPPH dalam tabung reaksi ditambah 100 µL metanol p.a pada sampel blanko. Sedangkan tabung reaksi berikut sebanyak 3,9mL larutan DPPH ditambah 100 µL bahan uji. Larutan divortex untuk membantu proses pencampuran dan inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Larutan dibaca absorbansinya pada spektrofotometer vis pada λ 517 nm.

Sebanyak 0,1mL larutan uji dalam metanol ditambahkan kedalam 3,9mL larutan DPPH 0,08 mM. Inkubasi dilakukan selama 60 menit dan absorbansi dibaca pada panjang gelombang maksimum DPPH. Blangko disiapkan dengan cara melarutkan 0,1mL larutan sampel ditambah 3,9mL metanol. Larutan kontrol DPPH terdiri dari 0,1mL metanol ditambah 3,9mL larutan DPPH 0,08 mM.

Analisis data

Data yang didapat berupa profil kromatogram yang dianalisis deskriptif untuk hRf senyawa pada pengamatan dibawah sinar UV 254, UV366, sinar tampak, dan pasca semprot. Data IC₅₀ dari fraksi air sebelum dan sesudah hidrolisis selama 1 jam atau 3 jam dianalisis secara statistika dengan uji paired sample t-Test dengan SPSS for windows 16.0. untuk mendeteksi adanya perbedaan yang signifikan.

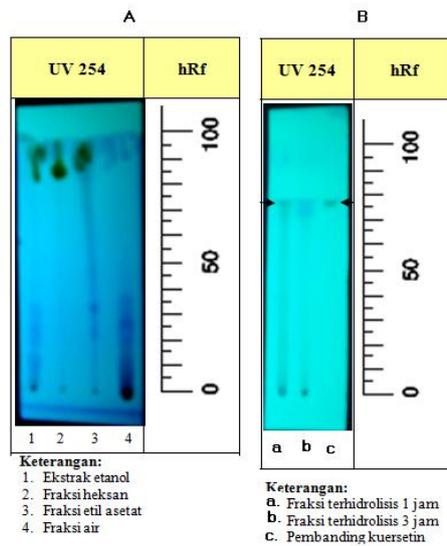
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 10 kg masing-masing dari daun mengkudu (DM) dan batang brotowali (BB) yang dikeringkan dalam oven 50 °C selama 10 jam sampai kering patah, kemudian diambil 500 g serbuk DM serta 500 g serbuk BB dimaserasi dengan etanol 96% (teknis). Ekstrak etanolik diperoleh 54,5 g (DM) dan 15,5 g (BB) atau dengan kata lain rendemennya sebesar 10,9% (DM) dan 3,1% (BB). Ekstrak kental DM berwarna hijau pekat, sedangkan ekstrak BB berwarna hijau tua kecoklatan.

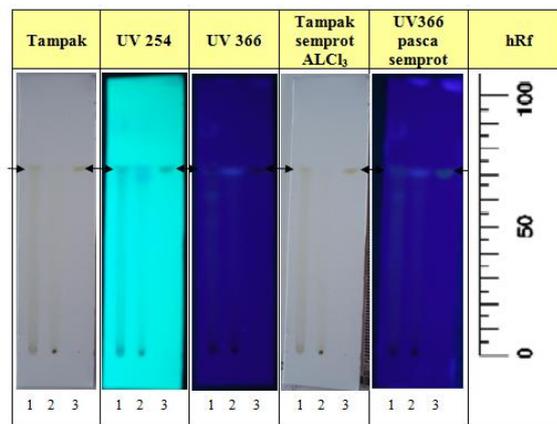
Tabel I. Rendemen hasil fraksinasi ekstrak etanol daun mengkudu dan batang brotowali

Bobot ekstrak etanol (g)	Fraksi	Bobot fraksi (g)		Rendemen (% b/b)	
		DM	BB	DM	BB
12	n-heksan	2,89	2,89	24,1	24,08
12	Etil asetat	0,21	1,75	6,1	14,58
12	Air	6,948	4,12	57,9	34,33

DM: daun mengkudu dan BB: batang brotowali

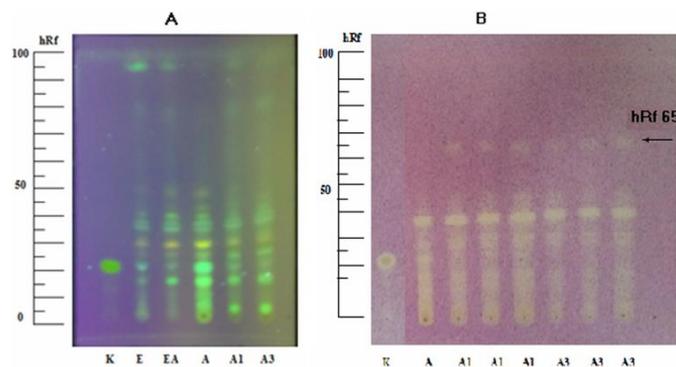


Gambar 1. Profil kromatogram ekstrak etanol dan fraksi-fraksinya (A) serta fraksi air terhidrolisis (B) daun mengkudu (DM) dengan pembanding kuersetin

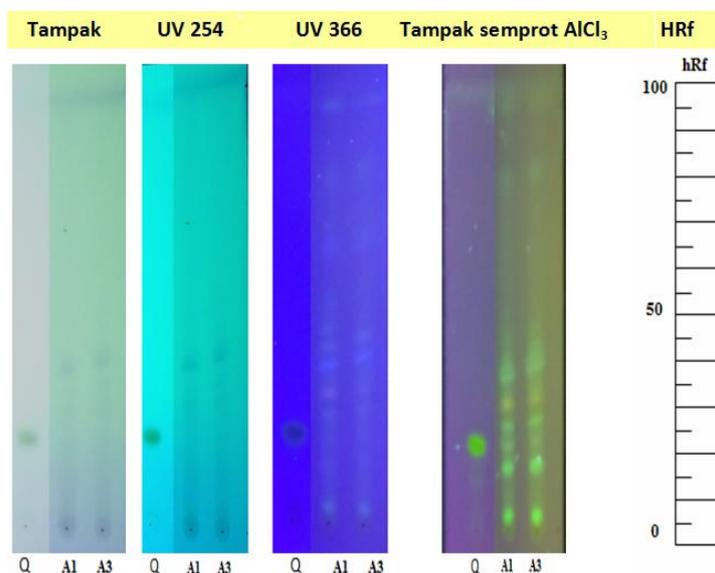


Gambar 2. Profil kromatogram fraksi air terhidrolisis daun mengkudu (DM) dengan pembanding kuersetin

Keterangan: Fraksi terhidrolisis 1 jam, 2. Fraksi terhidrolisis 3 jam dan 3. Pembanding kuersetin; Kondisi KLT; Fase ... Menurut Franco dkk (2010), hasil ekstrak dan aktivitas antioksidan ekstrak tanaman sangat tergantung pada polaritas solven yang akan menentukan keberhasilan penyarian senyawa antioksidan secara kualitatif dan kuantitatif. Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan etanol 96% (teknis) karena pelarut ini mempunyai toksisitas rendah dan dapat menghasilkan rendemen ekstrak cukup tinggi. Penyarian dengan etanol 96% telah dilakukan oleh Sang dkk (2001) untuk mendapatkan glikosida flavonoid dalam daun mengkudu dan hal sama pada batang brotowali dikerjakan oleh Irianti dkk. (2011).



Gambar 3. Kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya serta fraksi air terhidrolisis asam setelah disemprot $AlCl_3$ (A) dan fraksi air terhidrolisis setelah disemprot dengan DPPH. Fase diam silica gel F_{254} dan fase gerak kloroform:metanol:asam formiat (44:3,5:2,5 v/v).
Keterangan: K: pembeding kuersetin; E: Ekstrak etanolik; EA: fraksi etil asetat; A: fraksi air; A1: fraksi air terhidrolisis 1 jam; A3: fraksi air terhidrolisis 3 jam

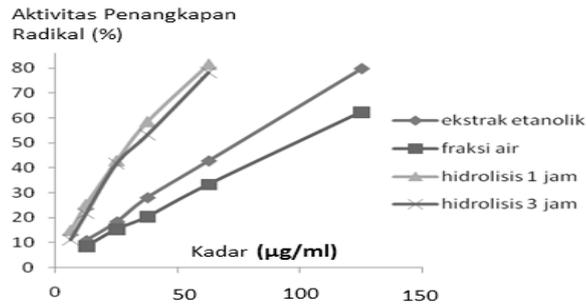


Gambar 4. Profil kromatogram fraksi air terhidrolisis batang brotowali dengan pembeding kuersetin.

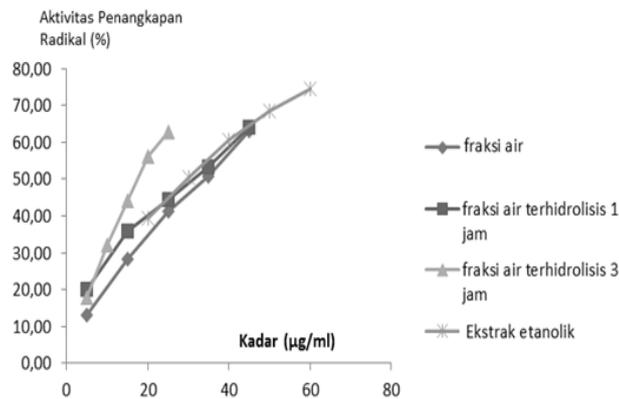
Ekstrak etanolik dari DM dan BB difraksinasi untuk mendapatkan fraksi air dengan kandungan glikosida flavonoid yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak kasar. Menurut Sang dkk (2001), fraksi tidak larut etil asetat atau disebut fraksi air pada penelitian ini mengandung banyak glikosida flavonoid. Proses fraksinasi diawali dengan partisi cair-cair dengan heksan. Heksan digunakan untuk memisahkan senyawa non polar seperti klorofil. Fraksi tidak larut heksan kemudian dipartisi cair-cair menggunakan etil asetat untuk memisahkan senyawa semi-polar dari ekstrak kasar, sedangkan fraksi tidak larut etil asetat diberi perlakuan hidrolisis asam. Masing-masing fraksi dipekatan sampai kental dan tabel I menunjukkan

rendemen fraksi air (tidak larut etil asetat) adalah tertinggi.

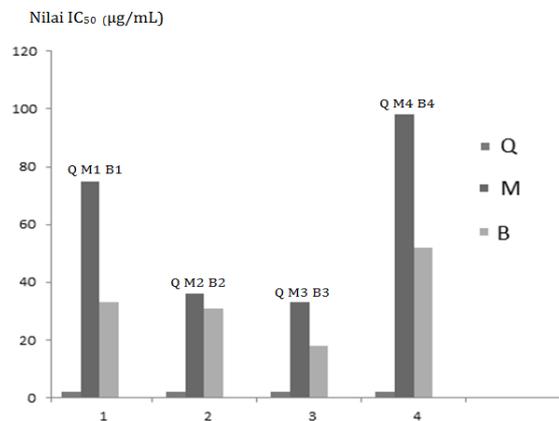
Proses hidrolisis pada suatu bahan sangat tergantung pada konsentrasi asam, waktu hidrolisis, suhu, dan komposisi pelarut (Biesaga dan Anna., 2007). Hidrolisis pada penelitian ini dilakukan dengan proses refluks pada sampel fraksi air dalam etanol 96% dengan katalis asam klorida 2 N. Campuran alkohol-asam pada proses ini berguna untuk melarutkan glikosida yang tidak larut dalam air, mencegah ketidaklarutan aglikon setelah dilakukan proses hidrolisis, dan mencegah hilangnya aglikon oleh proses autooksidasi (Harborne, 1965). Penggunaan asam klorida dalam proses hidrolisis untuk mendapatkan aglikon dengan sempurna dan



Gambar 5. Hubungan kadar dengan % penangkapan radikal DPPH pada ekstrak dan fraksi air terhidrolisis asam daun mengkudu



Gambar 6. Hubungan kadar dengan % penangkapan radikal DPPH pada ekstrak dan fraksi air terhidrolisis asam batang brotowali



Gambar 7. Nilai IC₅₀ fraksi air dan terhidrolisisnya pada daun mengkudu (M) dan batang brotowali (B). Keterangan: M1 dan B1 adalah fraksi air (Nilai IC₅₀ 75,65 dan 33,75 µg/mL); M2 dan B2 adalah fraksi air terhidrolisis asam 1 jam (Nilai IC₅₀ 36,27 dan 31,12 µg/mL); M3 dan B3 adalah fraksi air terhidrolisis asam 3 jam (Nilai IC₅₀ 33,36 dan 18,26 µg/mL); M4 dan B4 adalah ekstrak etanolik (Nilai IC₅₀ 98,68 dan 52,29 µg/mL)

untuk meminimalkan reaksi degradasi senyawa dalam ekstrak. Asam klorida merupakan katalis kuat sehingga mampu memecah ikatan glikosidik antara flavonoid dengan gugus gula. Asam klorida dilaporkan mempunyai efisiensi lebih tinggi dibanding asam sulfat (Wach dkk., 2007).

Waktu hidrolisis dilakukan selama 1 jam dan 3 jam dan dihentikan dengan cara mendinginkan labu alas bulat dalam air. Setelah proses hidrolisis selesai, dilakukan penarikan senyawa dengan etil asetat. Fase etil asetat diambil karena aglikon flavonoid mempunyai

kelarutan yang tinggi pada etil asetat, kemudian masing-masing fraksi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis untuk mengetahui kandungan aglikon flavonoid dalam fraksi hasil hidrolisis. Perbandingan yang digunakan adalah kuersetin, suatu standar aglikon flavonoid, dan profil kromatogram fraksi air terhidrolisis dengan perbandingan kuersetin dapat dilihat pada gambar 1 dan 2. Kuersetin mempunyai bercak pada R_f 75, pada R_f yang sama, fraksi air dengan perlakuan hidrolisis 1 jam (DM) menunjukkan adanya pola sama dengan perbandingan. Pada fraksi air dengan perlakuan hidrolisis 1 jam membuktikan adanya senyawa aglikon flavonoid seperti kuersetin, sedangkan pada perlakuan hidrolisis 3 jam menunjukkan bercak dengan nilai R_f sama namun warna fluoresensi yang berbeda.

Pada batang brotowali mempunyai kromatogram (gambar 3 dan 4) di semua fraksi pola bercak-bercak dengan jarak sama namun dengan intensitas warna berbeda. Pemisahan senyawa dengan cara fraksi jarang mencapai sempurna dan senyawa sama bisa terdapat dalam beberapa fraksi dengan perbandingan jumlah berbeda (Harborne, 1987). Nilai R_f besar menandakan senyawa pada bercak tersebut semakin kurang polar, hal ini dikarenakan pada uji KLT ini digunakan fase gerak cenderung non polar sementara fase diamnya polar, sehingga senyawa kurang polar akan lebih mudah terelusi. Dari hasil pengamatan bercak-bercak kromatogram pada sinar UV sebelum dan setelah penyemprotan, kemungkinan senyawa pada ekstrak dan fraksi batang brotowali adalah flavonol yang mengandung 3-OH bebas dan disertai atau tanpa 5-OH bebas dan isoflavon tanpa OH bebas. Jenis flavonoid ini terdapat baik dalam bentuk glikosida pada titik awal penotolan karena glikosida flavonoid bersifat polar sehingga kurang dapat terelusi oleh fase gerak non polar. Sementara aglikon flavonoid berada pada R_f yang lebih besar karena aglikon flavonoid bersifat kurang polar sehingga dapat lebih mudah terelusi oleh fase geraknya.

Adanya pembebasan aglikon flavonoid dari bentuk glikosidanya diperkuat dari bercak yang tampak pada kromatogram setelah penyemprotan dengan DPPH. Pada kromatogram setelah disemprot dengan DPPH, pada semua fraksi muncul bercak kuning pucat pada R_f 43, namun hanya pada fraksi air terhidrolisis 1 jam dan 3 jam saja muncul bercak kuning pada R_f 65. Bercak kuning setelah penyemprotan dengan DPPH merupakan senyawa golongan flavonoid dan pada R_f 65 menunjukkan aglikon flavonoid bebas setelah proses hidrolisis dengan sifat lebih non polar dibandingkan bentuk glikosida flavonoidnya.

Hal ini sesuai dengan hasil uji DPPH dimana aktivitas penangkapan radikal fraksi air terhidrolisis 3 jam lebih poten hampir 2 kali lipat dibanding fraksi air karena keberadaan bentuk glikosidanya menurunkan efisiensi antioksidan (Fuhrman & Aviram, 2002). Aglikon flavonoid mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih baik bila dibandingkan dengan bentuk glikosidanya. Sementara pada waktu hidrolisis 1 jam tidak menunjukkan adanya perbedaan signifikan aktivitas bila dibandingkan dengan fraksi air, diduga karena pada waktu 1 jam belum banyak aglikon flavonoid terbebaskan.

Pada kromatogram ekstrak etanolik batang brotowali dan fraksinya (gambar 3), fraksi air mempunyai bercak pada R_f 0 dan 10 yang tidak muncul pada fraksi air terhidrolisis, sementara pada fraksi air terhidrolisis 1 dan 3 jam nampak bercak juga pada R_f 65 dan 80 tidak tampak pada fraksi air. Selain itu bercak dengan R_f 22 pada fraksi air nampak berkurang intensitasnya pada fraksi air terhidrolisis.

Uji penangkapan radikal DPPH merupakan salah satu metode *in vitro* untuk mengevaluasi kemampuan antioksidan suatu senyawa melalui mekanisme penangkapan radikal. Uji *in vitro* ini dapat digunakan untuk memperkirakan aktivitas antioksidan *in vivo* suatu senyawa. Senyawa yang kurang efektif secara *in vitro* tidak akan lebih baik aktivitasnya secara *in vivo*. Uji *in vitro* juga penting untuk memperkirakan dosis dalam studi *in vivo* (Haliwell dkk. 1995). Metode DPPH menggunakan parameter IC_{50} untuk menginterpretasi aktivitas antioksidan suatu senyawa dan IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi substrat yang menyebabkan aktivitas DPPH berkurang 50% (Molyneux 2004). Gambar 5 dan 6 menunjukkan perbandingan nilai IC_{50} antar fraksi. Semakin kecil nilai IC_{50} menandakan semakin besar aktivitas senyawa dalam menangkap radikal DPPH.

Pengujian aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh fraksi air digunakan untuk membandingkan aktivitas penangkapan radikal sebelum dan setelah perlakuan hidrolisis. Dengan 5 seri kadar baik pada daun mengkudu (DM) dan batang brotowali (BB) dan perhitungan nilai IC_{50} diperoleh berturut turut pada ekstrak, fraksi air, fraksi air terhidrolisis 1 jam dan 3 jam adalah 98,68; 75,65; 36,27 dan 33,36 $\mu\text{g/mL}$ pada DM serta 52,29; 33,75; 31,12 dan 18,26 $\mu\text{g/mL}$ pada BB. Sedangkan sebagai perbandingan adalah aglikon flavonoid yaitu kuersetin dengan nilai IC_{50} adalah 1,53 $\mu\text{g/mL}$ dan kuersetin merupakan polifenol dengan aktivitas antioksidan yang tinggi serta pada tanaman banyak terkandung kuersetin.

Pembandingan kuersetin menunjukkan aktivitas penangkapan yang paling tinggi dibanding semua sampel uji, karena kemampuannya menangkap radikal bebas oleh adanya beberapa gugus hidroksi fenoliknya dengan membentuk radikal baru. Radikal kuersetin tersebut mampu distabilisasi lebih lanjut dengan adanya gugus ortodihidroksi fenolik pada cincin B dan dapat dilakukan juga oleh gugus fenolik pada cincin A (Nicivorovic dkk, 2010).

Aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh ekstrak DM dan BM lebih tinggi dibandingkan fraksi air (gambar 5 dan 6). Hal ini dikarenakan efek sinergisme dari dua atau lebih senyawa dengan berbagai kepolaran dalam daun mengkudu dan batang brotowali. Seperti dilaporkan oleh Hiranto dkk (2005) juga Zin dkk (2007) bahwa kebanyakan senyawa antioksidan alami bekerja sinergistik satu sama lain membentuk aktivitas antioksidan spectrum luas pada sistem pertahanan melawan radikal bebas. Proses fraksinasi pada ekstrak etanolik dapat memisahkan senyawa berefek sinergis tersebut sehingga aktivitas penangkapan radikalnya lebih kecil.

Adanya peningkatan aktivitas penangkapan radikal dari fraksi air batang brotowali (BB) dan daun mengkudu (DM) setelah perlakuan hidrolisis asam dapat ditunjukkan pada gambar 7. Setelah dilakukan proses hidrolisis asam selama 3 jam, aktivitas penangkapan radikal DPPH oleh fraksi air dapat meningkat 2 – 3 kali lipat dengan nilai IC_{50} sebesar 33 $\mu\text{g/mL}$ (DM) dan 18 $\mu\text{g/mL}$ (BB). Keberadaan senyawa aglikon flavonoid pada fraksi setelah dihidrolisis baik BB maupun DM menyebabkan aktivitas penangkapan radikal lebih tinggi.

Jun dkk. (2003) mengelompokkan aktivitas penangkapan radikal sesuai konsentrasi IC_{50} . Gambar 7 menunjukkan menurut nilai IC_{50} yang didapat, fraksi air, air terhidrolisis 1 jam, air terhidrolisis 3 jam tergolong sangat aktif.

KESIMPULAN

Perlakuan hidrolisis asam pada fraksi air daun mengkudu dan batang brotowali dapat meningkatkan aktivitas penangkapan radikal DPPH yang ditunjukkan pada nilai IC_{50} dari ekstrak etanolik daun mengkudu dan batang brotowali, fraksi air, dan hidrolisisnya (1 jam dan 3 jam) memiliki aktivitas penangkapan radikal DPPH pada daun mengkudu sebesar 75,65 $\mu\text{g/mL}$, 98,68 $\mu\text{g/mL}$, 36,27 $\mu\text{g/mL}$ dan 33,36 $\mu\text{g/mL}$ pada daun mengkudu. Sedangkan pada batang brotowali nilainya 33,75 $\mu\text{g/mL}$, 52,29 $\mu\text{g/mL}$, 31,12 $\mu\text{g/mL}$ dan 18,26 $\mu\text{g/mL}$.

UCAPAN TERIMAKASIH

Kepada Yth. Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) di Jakarta dan Jerman, Bapak Dekan Fakultas Farmasi Prof. Dr. Subagus Wahyuono, M.Sc., Apt, Frau Prof.Dr. Ulrike Holzgrabe dan Ibu Dr. Ritmaleni atas fasilitas dan dukungan morilnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amom Z., Bahari H., Isemail S., Ismail NA., Shah Z.Md. dan Arsyad MS. 2009. Nutritional composition, Antioxidant Ability and Flavonoid Content of *Tinospora crispa* stem. *Adv In Nat Appl Sci.* 3 (1), 88-94.
- Biesaga M. and Anna W.K.P., 2007, *Food Chemistry*, p. 699-704
- Deng S., Brett J. West, C. Jarakae Jensen, 2008, Simultaneous Characterisation and Quantitation of Flavonol Glycosides and Aglycones in Noni Leaves Using a Validated HPLC-UV/MS Method, *Food Chemistry*, 111, 526–529.
- Deng, Wangyuan, Guangzhong, 2011, A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay, *Food Chemistry* 125, 1430–1435
- Fuhrman, B. & Aviram, M., 2002, Polyphenols and Flavonoids Protect LDL Against Atherogenic Modifications, dalam Cadenas, E., Packer, L., (Eds.), *Handbook of Antioxidants*, 303-336, Marcel Dekker Inc., New York.
- Halliwell, B., R. Aeschbacht, J. Lorigert dan O. I. Aruoma, 1995, The Characterization of Antioxidants, *Fd Chem. Toxk*, Vol. 33, No. 7, pp. 601-617
- Harborne, J. B., 1965, Plant Polyphenols-XIV. Characterization of Flavonoid Glycosides by Acidic and Enzymic Hydrolyses, *Phytochemistry*, vol 4, pp 107-120
- Harborne, Jeffrey B., Christine A. Williams, 2000, Review: Advances in flavonoid research since 1992, *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Heim, Kelly E., Anthony R. Tagliaferro, Dennis J. Bobilya, 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572–584
- Hiranto dkk., 2001, Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation, *J.of Nut. Science and Vitaminology*, 47(5), 357-362.
- Irianti T., Puspitasari, A., dan Choirunisa NA., (2012), Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil Oleh ekstrak Metanol Daun Mengkudu dan Fraksi-fraksinya, *JBAI Vol.8 No. 2*, hal. 92-101.

- Irianti, T., Puspitasari, A. & Suryani, E., 2011, Aktivitas Penangkapan Radikal 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil oleh Ekstrak Etanolik Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) dan Fraksi-fraksinya, *Majalah Obat Tradisional*, 16 (3), 138-144.
- Jun, M.H.Y., Yu, J., Fong, X., Wan, C.S. & Yang, C.T., 2003, Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria labata* Ohwi), *J. Food Sci.*, **68**, 2117-2122.
- Kim, Gyo-Nam dan Hae-Dong Jang, 2010, Effect of Enzyme Treatment with β -Glucosidase on Antioxidant Capacity of Mulberry (*Morus alba* L.) Leaf Extract, *Food Sci. Biotechnol.* 19(5): 1341-1346
- Macedo, J.A., dkk., 2011, Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols, *Food Chemistry* 126, 491-497.
- Molyneux, Philips, 2004, The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 26(2):211-219
- Nic'iforovic', N, dkk., 2010, Antioxidant Activity of Selected Plant Species; Potential New Sources of Natural Antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3125-3130
- Pitchaon, M., 2011, Antioxidant capacity of extracts and fractions from mango (*Mangifera indica* Linn.) seed kernels, *International Food Research Journal* 18: 520-525
- Sang, Shengmin., dkk., 2001, Flavonol Glycosides and Novel Iridoid Glycoside from the Leaves of *Morinda citrifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4478-4481
- Scherer, Rodrigo dan Helena Teixeira Godoy, 2009, Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry* 112, 654-658
- Sharma and Bhat, 2009, DPPH antioxidant assay revisited, *Food Chemistry* 113, p 1202-1205
- Wach, Anna, Krystyna Pyrzynska, Magdalena Biesaga, 2007, Quercetin content in some food and herbal samples, *Food Chemistry* 100, 699-704
- Wang, M.Y., dkk., 2002, *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research, *Acta Pharmacol Sin*, 23 (1 2): 1127 -1141
- West, B.J., Deng S. dan Jensen C.J., 2009, Nutrient and phytochemical analyses of processed noni puree, *Food Res. Int.* Doi: 9. 1016/j.foodres. 2009.09.038
- Wang SY., Kuo YH., Chang HN., Kang PL., Tsay HS., Lin KF., Yang NS., and Shyur NF., 2002, Profiling and Characterisation Antioxidant Activities In *Anoectochilus Formosanus* Hayata, *J. Agric. Food. Chem.*, 50, 1859-1865
- Zin dkk (2006), Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L), *Food Chemistry* 94: 169-78.