

ANALISIS FENOLIK DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN PULUTAN (*Urena lobata*)

Putri Endrawati¹, Aris Rosidah¹, Yudi Purnomo^{1*}

¹Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA)

ABSTRAK

Pendahuluan: Senyawa antioksidan berperan dalam menghambat kerusakan oksidatif akibat radikal bebas dan banyak ditemukan pada tumbuhan. Daun pulutan (*Urena lobata*) adalah salah satu tumbuhan herbal yang menunjukkan aktivitas antioksidan tetapi belum diketahui secara pasti kandungan senyawa aktifnya. Salah satu upaya untuk mengetahuinya dengan menggunakan metode fraksinasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar fenol total fraksi etil asetat daun pulutan dan aktivitas antioksidannya.

Metode: Eksperimental laboratorium untuk menganalisa kandungan senyawa aktif yang terdapat pada fraksi etil asetat daun pulutan dengan metode skrining fitokimia, kadar fenol total menggunakan metode *Folin-Ciocalteu*, dan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan vitamin E sebagai standart. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan pengulangan sebanyak tiga kali, kemudian data dinyatakan dengan persen inhibisi ($\bar{X} \pm SD$) dan nilai IC₅₀ yang dihitung dari persamaan linier.

Hasil: Fraksi etil asetat daun pulutan mengandung senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik. Kadar fenol total fraksi etil asetat daun pulutan adalah 493,33 mg GAE/g. Fraksi etil asetat daun pulutan memiliki aktivitas antioksidan (IC₅₀ = 8,43 µg/mL) lebih rendah dibandingkan vitamin E (IC₅₀ = 2,55 µg/mL) namun keduanya memiliki aktivitas antioksidan kategori sangat kuat.

Kesimpulan: Fraksi etil asetat daun pulutan memiliki kandungan zat aktif alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik serta aktivitas antioksidan lebih rendah bila dibandingkan dengan vitamin E namun keduanya memiliki nilai yang masuk dalam kategori sangat kuat.

Kata Kunci: pulutan; antioksidan; total fenol; DPPH.

* Korespondensi :

Yudi Purnomo

MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail : y_purnomo92@yahoo.com, telepon: (0341) 558959

ANALYSIS PHENOLIC AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ETHYL ACETATE FRACTION OF PULUTAN LEAVES (*Urena lobata*)

Putri Endrawati¹, Aris Rosidah¹, Yudi Purnomo^{1*}

¹Faculty of Medicine, University of Islam Malang (UNISMA)

ABSTRACT

Introduction: Antioxidants compounds play a role in inhibiting oxidative damage due to free radicals and are found in many herbs. Pulutan leaf (*Urena lobata*) is one of the herbs that show antioxidant activity but the content of the active compounds is not known with certainty. One attempt to find out is by using the fractionation method. This study was aimed to find out the total phenolic levels of the ethyl acetate fraction of pulutan leaves and their antioxidant activity.

Method: Laboratory experiments to analyze the content of active compounds contained in the ethyl acetate fraction of pulutan leaves using a phytochemical screening method, total phenol content using the *Folin-Ciocalteu* method, and antioxidant activity using the DPPH method with vitamin E as the standard. The antioxidant activity test was repeated three times, then the data was expressed by the percent inhibition ($X \pm SD$) and the IC₅₀ value calculated from the linear equation.

Result: The ethyl acetate fraction of pulutan leaves contains alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids, and phenolic compounds. The total phenol content of the ethyl acetate fraction of pulutan leaves was 493.33 mg GAE/g. The ethyl acetate fraction of pulutan leaves had lower antioxidant activity (IC₅₀ = 8.43 g/mL) than vitamin E (IC₅₀ = 2.55 g/mL) but both had very strong antioxidant activity.

Conclusion: The ethyl acetate fraction of pulutan leaves contains active substances of alkaloids, steroids, triterpenoids, flavonoids, and phenolics as well as lower antioxidant activity when compared to vitamin E but both have values that fall into the very strong category.

Keyword: pulutan; antioxidants; total phenolic; DPPH.

*Corresponding author:

Yudi Purnomo

MT. Haryono 193 Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

e-mail : y_purnomo92@yahoo.com, phone: (0341) 558959

PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab terjadinya kerusakan oksidatif sel pada penyakit degeneratif. Radikal bebas adalah molekul kimia yang bersifat sangat reaktif karena tidak memiliki pasangan elektron pada kulit terluarnya¹. Radikal bebas dapat terbentuk dalam tubuh seperti hasil proses oksidasi, metabolisme, dan peradangan. Sedangkan dari luar tubuh antara lain akibat paparan rokok, polutan, radiasi matahari, dan senyawa xenobiotik². Radikal bebas yang berlebihan dalam tubuh dapat menimbulkan kondisi stres oksidatif dan kerusakan pada DNA, lipid, dan protein pada sel. Interaksi radikal bebas pada basa nukleotida DNA menimbulkan mutasi DNA, sedangkan pada lipid terjadi pembentukan lipid peroksida (*malondialdehyde*), dan pada protein menghasilkan denaturasi protein. Kondisi tersebut dapat menyebabkan kerusakan struktur sel dan penurunan fungsi sel sehingga dalam jangka waktu panjang memicu terjadinya penyakit degeneratif³. Pemberian senyawa antioksidan diharapkan dapat mencegah timbulnya penyakit degeneratif⁴.

Antioksidan berperan menghambat aktivitas radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa yang bekerja melindungi sel dan organ tubuh dari kerusakan oksidatif akibat paparan radikal bebas⁵. Antioksidan bekerja memberikan atom hidrogen pada senyawa radikal bebas sehingga mengurangi sifat reaktivitasnya. Antioksidan terdiri dari senyawa enzimatis seperti Superoksida dismutase (SOD), Glutation peroksidase (GPx), dan katalase (CAT) atau senyawa non enzimatis seperti flavonoid, vitamin E, vitamin C, dan betakaroten⁶. Antioksidan dapat berasal alam seperti buah-buahan, sayur-sayuran, biji-bijian, dan bahan pangan lainnya⁷. Bahan alam yang memiliki aktivitas antioksidan antara lain senyawa fenolik seperti quercetin, kaempferol, dan tiliroside. Senyawa terpenoid seperti likopen dan beta karoten⁸. Serta senyawa alkaloid seperti eritrina dan karpain^{9,10}.

Pulutan merupakan salah satu herbal yang memiliki khasiat obat. Berdasarkan data empirik daun Pulutan dimanfaatkan untuk mengobati malaria, demam, luka, dan sakit gigi. Menurut data preklinik daun Pulutan diketahui memiliki senyawa flavonoid dengan aktivitas antioksidan.¹¹ Flavonoid merupakan senyawa golongan fenolik yang banyak ditemukan pada tanaman dan berperan sebagai antioksidan alami¹². Adapun penelitian lain menunjukkan dekokta daun pulutan menghambat persentase bentuk abnormal eritrosit dan penurunan kadar hemoglobin akibat paparan malathion kronik pada ikan zebra dewasa¹³. Beberapa studi menunjukkan ekstrak kasar daun Pulutan lebih banyak dieksplorasi dibandingkan bentuk ekstrak halus atau fraksi. Fraksi merupakan hasil dari proses fraksinasi menggunakan pelarut organik untuk memisahkan senyawa berdasarkan kepolarannya¹⁴. Hasil pengambilan senyawa aktif

pada herbal dengan metode fraksinasi lebih selektif memisahkan kandungan zat aktif herbal dengan pelarut sesuai kepolarannya dibandingkan dengan metode ekstraksi seperti maserasi, perkolasi dan sokhletasi yang hasilnya kompleks. Pelarut untuk metode fraksinasi dapat digunakan dari yang bersifat non polar sampai polar disesuaikan dengan zat aktif yang diambil¹⁵. Menurut Smallwood, M. (1996) etil asetat adalah pelarut organik yang bersifat semipolar dengan nilai konstanta dielektrik sebesar 6,02 sehingga dapat menarik senyawa non polar seperti senyawa alkaloid, steroid, dan triterpenoid. Vitamin E merupakan vitamin larut lemak yang memiliki aktivitas antioksidan¹⁷. Melihat potensi yang besar dari tanaman pulutan, maka dari itu peneliti tertarik untuk melakukan analisis kadar fenol total dan aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat daun pulutan menggunakan metode DPPH dengan vitamin E sebagai standart.

METODOLOGI PENELITIAN

Desain, Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental laboratorium dengan menganalisa kadar fenolik dan aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun pulutan. Daun pulutan yang digunakan didapatkan dari daerah Batu, Malang, dan telah dideterminasi oleh UPT Laboratorium Herbal Materia Medika Batu dengan nomor surat 074/555A/102.7/2020. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan maret hingga bulan september 2021 di Laboratorium Biokimia Universitas Islam Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, dan Balai Materia Medika Batu.

Prosedur Penelitian

Pembuatan Fraksi Daun Pulutan

Simplisia daun pulutan diekstraksi menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi lalu dievaporasi dan didapatkan ekstrak kental daun Pulutan. 15 gram ekstrak kental daun pulutan dimasukkan dalam corong pisah kemudian ditambahkan pelarut N-heksan dan air dengan volume yang sama lalu dikocok selama kurang lebih 15 menit untuk setiap pengulangan. Kemudian fase air dengan fase N-heksane dipisahkan. Fase air dimasukkan kembali kedalam corong pisah dan ditambahkan etil asetat. Kemudian didapatkan fase etil asetat dan fase air. Fraksinasi dilakukan dengan pengulangan beberapa kali dan dihentikan bila warna pelarut menjadi lebih terang atau memudar. Hasil fraksinasi dikumpulkan lalu diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 60°C hingga diperoleh fraksi etil asetat daun pulutan dalam bentuk pasta.

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia fraksi etil asetat daun pulutan dilakukan untuk menentukan kandungan senyawa steroid dan triterpenoid, alkaloid, flavonoid, fenolat, dan saponin. Berdasarkan

metode Harborne (2006) dengan reagen berturut-turut asetat anhidrat ditambah dengan H₂SO₄ pekat, meyer, HCl pekat, FeCl₃ 1%, sedangkan saponin ditambahkan air kemudian dididihkan. Pada proses skrining fitokimia pengamatan perubahan warna dilakukan oleh dua orang yang bertujuan untuk mengurangi bias atau kesalahan hasil penelitian.

Uji Kadar Fenol Total

Pengujian kadar fenol total dilakukan dengan metode spektrofotometer Uv-Vis dengan reagen *Folin-Ciocalteu* yang sedikit dimodifikasi. Fraksi etil asetat daun pulutan 10 mg dilarutkan dalam 10 mL pelarut etanol kemudian ditambahkan 5 mL aquadest dan 0,75 mL reagen *Follin-Ciocalteu*. Selanjutnya dibiarkan 5 menit dan ditambahkan 0,75 mL Na₂CO₃ 7% dan larutan dihomogenkan menggunakan vorteks dan diinkubasi pada suhu 45° C selama 15 menit di tempat yang terhindar dari sinar matahari. Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 735 nm. Asam galat digunakan sebagai kontrol dengan variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 µg/mL yang bertujuan untuk menghasilkan persamaan garis linier. Pengujian pada sampel dilakukan tiga kali untuk mendapatkan data yang akurat. Kandungan senyawa fenol dalam sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat dan

$$C = \frac{a \cdot V / 1000}{G}$$

dinyatakan dalam satuan mg ekuivalen asam galat/g fraksi (mg GAE/g fraksi) dengan rumus perhitungan:

Keterangan:

- C = Total fenol
- a = Konsentrasi asam galat (mg/L)
- V = Volume larutan uji (mL)
- G = Massa fraksi (g)

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan ini mengacu pada penelitian Ridho (2013) dengan beberapa modifikasi. Larutan uji dibuat sebanyak 1 mL fraksi dengan konsentrasi 10, 9, 8, dan 7 µg/mL. Kontrol positif vitamin E juga dibuat dengan konsentrasi 10, 9, 8, dan 7 µg/mL. Kemudian masing-masing larutan ditambahkan dengan larutan blanko yang merupakan larutan DPPH (5 mg DPPH dalam 100 mL metanol) dengan perbandingan 1:1. Kemudian campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi ditempat gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang sekitar 517 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga didapatkan panjang gelombang maksimal.

Perhitungan nilai IC₅₀ dilakukan dengan persamaan regresi linier yang didapatkan dari kurva linier. Konsentrasi sampel uji (garis X) dan persen inhibisi sampel uji (garis Y).

Persamaan regresi linier sebagai berikut :

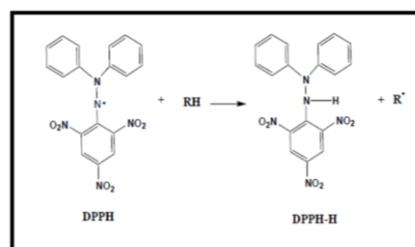
$$y = bx + a$$

Adapun cara menghitung nilai persen inhibisi dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = 1 - \frac{As}{Ac} \times 100\%$$

Keterangan :

- Ac = Absorbansi kontrol
- As = Absorbansi sampel



Gambar 1. Reduksi DPPH oleh senyawa antioksidan (Prakash, Rigelhof, dan Miller, 2001).

Potensi antioksidan dibagi menjadi lima kategori berdasarkan nilai IC₅₀. Kategori tersebut antara lain sangat kuat (< 50 µg/mL), kuat (50-100 µg/mL), sedang (100-150 µg/mL), lemah (150-200 µg/mL) dan sangat lemah (> 200 µg/mL).

Analisa Data

Analisa statistik yang digunakan adalah analisa statistik deskriptif. Data dinyatakan dengan $\bar{X} \pm SD$. Kemudian persamaan regresi linier digunakan untuk perhitungan nilai IC₅₀ yang menyatakan hubungan antara rata-rata % inhibisi (y) dan konsentrasi sampel uji (x), dengan persamaan garis linier $y = bx + a$. Analisis statistik deskriptif ini dihitung dengan menggunakan *Microsoft Excel 2016 for Windows*.

HASIL PENELITIAN

Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia fraksi etil asetat daun pulutan mengandung senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolat dapat dilihat pada **tabel 1**.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun pulutan (*Urena lobata*)

Uji fitokimia	Metode (Pereaksi)	Perubahan warna	Lampiran	Hasil uji	Pengamat	
					I	II
Alkaloid	Mayer	Terdapat endapan coklat		+	+	+
Steroid	Asetat anhidrat + H ₂ SO ₄ pekat	Mengalami perubahan warna menjadi kehijauan		+	+	+
Triterpenoid	Asetat anhidrat + H ₂ SO ₄ pekat	Terbentuknya cincin coklat		+	+	+
Flavonoid	HCl pekat	Perubahan warna menjadi kekuningan		+	+	+
Fenolat	FeCl ₃	Terdapat perubahan warna hitam		+	+	+
Saponin	Akuades, dipanaskan,	Tidak terbentuk busa stabil		-	-	-

Keterangan: (+) teridentifikasi; (-) tidak teridentifikasi

Hasil Uji Kadar Fenol Total

Larutan asam galat yang dibuat variasi konsentrasi kemudian diukur menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 735 nm sehingga didapatkan nilai absorbansi seperti pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Absorbansi Asam Galat

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi
10	0,2241
20	0,2339
30	0,2480
40	0,2517
50	0,2722

Keterangan: asam galat dan absorbansinya dibuat kurva linier sehingga didapatkan $y = 0,0011x + 0,2118$.

Didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0011x + 0,2118$ dengan koefisien relasi determinasi $r = 0,9634$. Persamaan garis linier yang didapatkan dari kurva kalibrasi selanjutnya digunakan untuk menetapkan kadar total fenol pada fraksi etil asetat daun pulutan. Hasil pengukuran dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Perhitungan Kadar Total Fenol

Replikasi	Absorbansi	Kadar Fenol Total (mg GAE/g)	\bar{X} Kadar Fenol Total (mg GAE/g)
1	0.7545	493,36	493,33 ± 0,05*
2	0.7544	493,27	
3	0.7545	493,36	

Keterangan: (*) perhitungan dengan ekstrapolasi.

Berdasarkan tabel diatas, kadar total fenolik pada fraksi etil asetat daun pulutan diperoleh sebesar 493,33 mgGAE/g ekstrak.

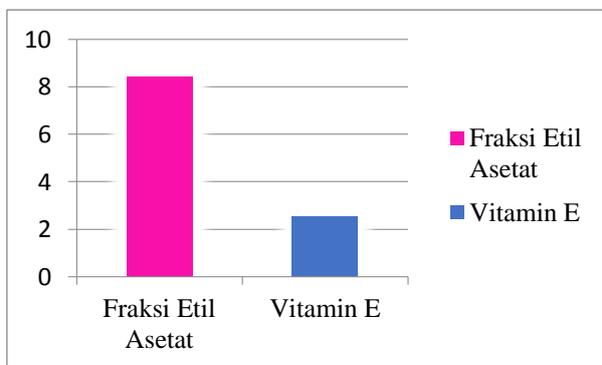
Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Pulutan

Bioaktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun pulutan beserta Vitamin E sebagai pembanding dapat dilihat pada **Tabel 4** dan **Gambar 2** berikut:

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

Sampel	C (µg/mL)	n	% inhibisi $\bar{X} \pm SD$	IC ₅₀ (µg/mL)	Kategori
Fraksi Etil Asetat	10	3	61,46 ± 0,34	8,43	Sangat kuat
	9	3	56,74 ± 0,34		
	8	3	45,82 ± 0,17		
Vitamin E	7	3	38,35 ± 0	2,55	Sangat Kuat
	10	3	82,30 ± 2,95		
	9	3	79,25 ± 2,95		
	8	3	75,52 ± 0,29		
	7	3	68,73 ± 0,29		

Keterangan: C: kadar; n: pengulangan; IC₅₀: *Inhibitory Concentration of 50%*; SD: Standar



Gambar 2. Histogram nilai IC₅₀ fraksi etil asetat daun pulutan dengan vitamin E

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan hasil aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun pulutan (IC₅₀ = 8,43 µg/mL) memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah bila dibandingkan dengan vitamin E (IC₅₀ = 2,55 µg/mL) namun keduanya memiliki nilai IC₅₀ dalam kategori sangat kuat.

PEMBAHASAN

Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia fraksi etil asetat daun pulutan mengandung senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik. Hasil ini sesuai dengan penelitian Afriani *et al*, (2016) dan Ramadenti *et al*, (2017) menggunakan fraksi etil asetat dengan tumbuhan berbeda, bahwa dalam fraksi etil asetat tersebut mengandung senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik. Berdasarkan kepolaran dan kelarutan, senyawa yang bersifat polar akan mudah larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa nonpolar akan mudah larut dalam pelarut nonpolar²¹. Pelarut nonpolar efektif terhadap alkaloid, selain itu alkaloid dapat juga larut dalam pelarut semi polar seperti etil asetat dan polar seperti metanol²². Triterpenoid atau steroid merupakan senyawa aktif yang termasuk dalam jenis antioksidan non polar²³. Fenolik dan flavonoid termasuk dalam jenis intermediet antioksidan yang berperan sebagai antioksidan polar dan non polar yang dipengaruhi oleh gaya dipol-dipol induksi atau gaya London yang menyebabkan senyawa polar dapat larut atau sedikit larut pada senyawa nonpolar^{24,42}. Fraksi etil asetat tidak menunjukkan adanya penarikan pada senyawa saponin karena saponin merupakan senyawa polar²². Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Cahya, *et al* (2021) pada fraksi air positif menunjukkan penarikan pada saponin.

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang memiliki satu atau lebih cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil⁴⁷. Hasil penelitian Berliansyah, *et al* (2021) menunjukkan bahwa fraksi N-butanol daun pulutan mengandung senyawa fenolik. Senyawa fenolik banyak ditemukan pada tanaman dan memiliki beberapa efek sebagai antioksidan, antiinflamasi, antimikrobal, dan antikarsinogenik⁴⁸.

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari kelompok senyawa fenolik yang sering dijumpai

pada berbagai macam tumbuhan yang berfungsi sebagai antioksidan. Berdasarkan penelitian Purnomo, *et. al.* (2015) bahwa dalam ekstrak etanol daun pulutan (*Urena lobata*) mengandung senyawa flavonoid yaitu Mangiferin dan Gossypetin. Flavonoid efektif sebagai scavenger spesies reaktif, misalnya super dioksida, radikal peroksid, dan peroksinitrit dengan cara mentransfer atom H⁺^{24,33}.

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam. Hasil penelitian Ramadenti (2017) menunjukkan bahwa senyawa alkaloid juga ditemukan pada fraksi etil asetat daun *P. canescens* sungkai. Alkaloid mempunyai efek fisiologi yang menonjol dan sering digunakan secara luas dalam bidang pengobatan dan juga memiliki efek farmakologi sebagai antioksidan dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas. Mekanisme ini menunjukkan bahwa alkaloid bekerja sebagai antioksidan primer^{25, 26, 27}.

Steroid merupakan senyawa yang memiliki peran sebagai antioksidan, menurut Raffaaf (1970) terdapat beberapa spesies *Fabaceae* yang mengandung steroid dan banyak dimanfaatkan untuk pengobatan berbagai penyakit diantaranya sebagai analgesik, antihipertensi, antimikrobal, antibakteri, dan antioksidan²⁹.

Mekanisme antioksidan dari triterpenoid adalah dengan cara menangkap atau *scavenging spesies* reaktif, misalnya superoksida, dan mengkelat logam (Fe²⁺ dan Cu²⁺). Hasil penelitian Abrosca, *et al* (2006) menunjukkan bahwa senyawa triterpenoid dari *Annurca aple* memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan menghambat peroksidasi lipida³⁰.

Berdasarkan uraian tersebut, efek farmakologi dari senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik yang terkandung pada fraksi etil asetat daun pulutan berpotensi sebagai antioksidan. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jumlah kadar alkaloid, steroid, triterpenoid, dan flavonoid yang teridentifikasi pada skrining fitokimia.

Uji Kadar Fenol Total

Kadar fenol total pada penelitian fraksi etil asetat daun pulutan adalah 493,33 mg GAE/g dihitung menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* dan asam galat sebagai standart. Asam galat adalah senyawa fenolik antioksidan alami yang diekstrak dari tanaman dan bersifat stabil³⁵. Prinsip dasar untuk metode ini adalah oksidasi gugus fenolik-hidroksil. Pereaksi *Folin-Ciocalteu* mengoksidasi fenolat serta mereduksi asam hetero -tungstenpoli menjadi suatu kompleks molybdeum (Mo-W). Selama reaksi berlangsung, gugus fenolik-hidroksil akan bereaksi dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* membentuk kompleks fosfotungstat-fosfomolibdat berwarna biru³⁶. Kadar fenol total fraksi etil asetat daun pulutan dua kali lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian daun pulutan yang pernah dilakukan oleh Berliansyah, *et al* (2021) pada fraksi

N-butanol sebesar 286.54 mgGAE/g dan penelitian Cahya, *et al* (2021) pada fraksi air 203,34 mgGAE/g.

Senyawa fenolik merupakan metabolit sekunder yang ditemukan tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti buah, daun, dan batang. Senyawa fenolik memiliki ciri khas yaitu memiliki satu atau lebih gugus hidroksil (OH) pada struktur cincinnya. Mekanisme senyawa fenolik sebagai antioksidan melalui kemampuan gugus fenol untuk berpasangan dengan radikal bebas dengan cara mendonorkan atom hidrogennya melalui transfer elektron, proses ini mengubah fenol menjadi radikal fenoksil. Radikal fenoksil dapat menstabilkan diri melalui proses resonansi sehingga tidak terjadi reaksi pembentukan radikal bebas berantai⁴⁹.

Kekurangan uji kadar fenol total pada penelitian ini adalah kurva baku yang digunakan memiliki rentang yang lebih rendah dari absorbansi sampel sehingga perlu dilakukan ekstrapolasi untuk perhitungan kadar total fenol. Oleh karena itu penelitian selanjutnya perlu menggunakan kurva baku dengan rentang lebih lebar.

Uji Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun pulutan memiliki nilai IC_{50} 8,43 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Efek antioksidan pada fraksi etil asetat daun pulutan diduga dikendalikan oleh senyawa alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik yang terkandung didalamnya. Senyawa fenol mempunyai kemampuan sebagai pereduksi, penangkap radikal bebas, pengkelat logam, peredam terbentuknya oksigen singlet serta pendonor elektron⁴¹. Mekanisme antioksidan dari flavonoid adalah menangkap ROS secara langsung, mencegah regenerasi ROS, dan secara tidak langsung dapat meningkatkan aktivitas antioksidan enzim antioksidan seluler³³. Pencegahan terbentuknya ROS oleh flavonoid dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menghambat kerja enzim xantin oksidase dan *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate* (NADPH) oksidase, serta mengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) sehingga dapat mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan radikal bebas^{33,34}. Alkaloid sebagai antioksidan adalah dengan cara mendonorkan atom H pada radikal bebas dan diduga turut bertanggung jawab sebagai penangkap radikal bebas³⁹. Steroid memiliki aktivitas antioksidan sekunder *radical scavenger* yang cukup aktif dengan cara menangkap radikal bebas⁴⁰. Mekanisme antioksidan dari triterpenoid adalah dengan cara menangkap atau *scavenging spesies* reaktif, misalnya superoksida, dan mengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+})³⁰.

Bioaktivitas antioksidan fraksi etil asetat menunjukkan bahwa fraksi tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat begitu juga dengan vitamin E ($IC_{50}=2.55 \mu\text{g/mL}$) sebagai pembanding. Tetapi aktivitas antioksidan fraksi etil asetat empat kali lebih rendah jika dibandingkan

dengan vitamin E. Salah satu faktor yang menyebabkan perbedaan aktivitas antioksidan diduga pada fraksi etil asetat daun pulutan terdiri dari berbagai macam senyawa aktif dengan konsentrasi yang rendah dan sebagian besar kandungan senyawa aktif antioksidan daun pulutan yang bersifat polar, sehingga sedikit tertarik oleh pelarut etil asetat yang bersifat semipolar cenderung non polar^{11,16}. Sedangkan vitamin E adalah senyawa antioksidan murni, sehingga tidak terjadi interaksi antar komponen. Vitamin E merupakan vitamin larut lemak. Penggunaan vitamin E sebagai pembanding pada riset ini dikarenakan vitamin E memiliki fungsi antioksidan sebagai donor ion hidrogen yang mampu mengubah radikal peroksil menjadi radikal *tocopherol* yang kurang reaktif, sehingga tidak mampu merusak rantai asam lemak⁴³. Mekanisme tersebut sama seperti mekanisme kerja senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi etil asetat daun pulutan. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun pulutan ($IC_{50}=8,43 \mu\text{g/mL}$) lebih tinggi jika dibandingkan dengan fraksi N-butanol ($IC_{50}=68,61 \mu\text{g/mL}$) fraksi air ($IC_{50}=60,79 \mu\text{g/mL}$), dan fraksi N-heksan ($IC_{50}=16.31 \mu\text{g/mL}$)^{37,38,50}.

Aktivitas antioksidan dari suatu sampel uji didasarkan pada kemampuannya dalam meredam aktivitas radikal bebas DPPH melalui donasi atom hidrogen atau elektron. Dalam analisis tersebut, *1,1-difenil-2-pikrihidrazil* (DPPH) bertindak sebagai senyawa radikal sintetik yang akan menerima atom hidrogen dari senyawa ekstrak yang aktif antioksidannya. Pendonoran atom hidrogen pada DPPH akan mengubah bentuk DPPH yang radikal menjadi non-radikal yang dapat diamati secara visual melalui perubahan warnanya dan secara kuantitatif melalui absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm. Apabila terdonasi atom hidrogen DPPH akan berubah menjadi bentuk non-radikal yang ditandai dengan memudarnya warna ungu menjadi lebih muda hingga kuning⁴⁴.

Parameter yang digunakan untuk uji penangkapan radikal DPPH adalah dengan melihat nilai IC_{50} . Nilai tersebut merupakan suatu konsentrasi yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} diperoleh dari suatu perhitungan persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen penghambatan. Nilai IC_{50} semakin kecil menunjukkan bahwa aktivitas antioksidannya semakin tinggi⁴⁵.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Skrining fitokimia fraksi etil asetat daun pulutan mengandung alkaloid, steroid, triterpenoid, flavonoid, dan fenolik.
2. Total fenol pada fraksi etil asetat daun pulutan sebesar 493,33 mg GAE/g yang berarti setiap gram fraksi etil asetat daun pulutan mengandung asam galat sebesar 493,33 mg.

3. Fraksi etil asetat daun pulutan ($IC_{50}=8,43 \mu\text{g/mL}$) memiliki aktivitas antioksidan lebih rendah bila dibandingkan dengan vitamin E ($IC_{50} = 2,55 \mu\text{g/mL}$) namun keduanya memiliki nilai IC_{50} dalam kategori sangat kuat.

SARAN

Dari hasil pembahasan penelitian ini, peneliti menyarankan:

1. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui jumlah kadar alkaloid, steroid, triterpenoid, dan flavonoid yang teridentifikasi pada skrining fitokimia.
2. Perlu dilakukan pembuatan kurva baku untuk penetapan kadar fenol total dengan interval konsentrasi yang lebih lebar agar valid.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada IOM (Ikatan Orang tua Mahasiswa) dan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Adwas A. A., Ata S. I., Azab E. A., and Fawzia A. Q. 2019. *Oxidative Stress and Antioxidant Mechanisms in Human Body*. **Appl Biotechnol Bioeng**.
- [2] Tapan, Erik. 2005. Penyakit Degeneratif. Jakarta: PT. Elex Media Komputindo.
- [3] Leong, L.P., and Shui. 2002. 'An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets', **Food Chemistry**, 76: 69-75, 102:732-737.
- [4] Huy, Lien Ai Pham, Hua Hue, Chuong Pam. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **International Journal of Biomedical Science**, 4(2): 89-96.
- [5] Hernani, dan Raharjo, M. 2005. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- [6] Kurutas, E. B. 2016. The Importance of Antioxidants Which Play The Role in Cellular Response Against Oxidative/Nitrosative Stress: Curret State. **Nutrition Journal**, 15(1): 1-22.
- [7] Inggrid, M., dan Herry, S. 2014. Ekstraksi Antioksidan dan Senyawa Aktif dari Buah Kiwi (*Actinidia deliciosa*). Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Katolik Parahyangan.
- [8] Lai, H. Y., and Lim, Y. Y. 2011. Evaluation of Antioxidant Activities of The Methanolic Extracts of Selected Ferns in Malaysia. **International Journal of Environmental Science and Development**, Volume 2(6): 442-447.
- [9] Nugraha, S. 2019. *Alkaloid Golongan Alkenoid dari Kulit Batang Erythrina subumrans (Fabaceae) dan Aktivitas Antioksidan*. Universitas Padjajaran.
- [10] Bulla R. M., Cunha, T. M. Da, & Nitbani, F. O. 2020. Identifikasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Alkaloid Daun Pepaya (*Carica papaya L.*) Kultivar Lokal. **Chem. Notes**, 1(1), 58-68.
- [11] Babu, S. S. Madhuri, D. B. Ali, S. L. A Pharmacological Review of Urena Lobata Plant. **Asian J Pharm Clin Res**. 2016; 9(2): 20-22.
- [12] Dhurhanian, C. E., & Novianto, A. 2018. 'Uji Kandungan Fenolik Total dan Pengaruhnya terhadap Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Bentuk Sediaan Sarang Semut (*Myrmecodia pendens*)'. **Jurnal Farmasi Dan Ilmu Kefarmasian Indonesia**, 5(2), 63.
- [13] Sofiani, M., W, D. N., & Purnomo, Y. 2019. *Efek Dekokta Daun Pulutan (Urena lobata) Terhadap Kadar Hemoglobin dan Persentase Sel Darah Merah Abnormal Ikan Zebra (Danio rerio) Dewasa yang dipapar Malathion Secara Kronik*. 239-246.
- [14] Harborne, J. B. 2006. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- [15] Khopkar, S.M., 2008, Konsep Dasar Kimia Analitik, UI Press, Jakarta.
- [16] Smallwood, M. 1996. Handbook of Organic Solvent Properties, John Wiley & Sons Inc., New York, P.7, 65, 227.
- [17] Niki E., Traber M. G. 2012. A history of vitamin E. **Ann Nutr Metab** 2012; 61:207-12.
- [18] Ridho, E. Al. 2013. Uji aktivitas antioksidan ekstrak methanol buah lakum (*Cayratia trifolia*) dengan metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrazil).
- [19] Afriani, N., Idiawati, N. and Alimuddin, A. H. (2016) 'Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Akar Mentawa (*Artocarpus anisophyllus*) terhadap Larva Artemia salina', **Jurnal Kimia Khatulistiwa**, 5(1), pp. 58-64.

- [20] Ramadenti, F., Sundaryono, A. and Handayani, D. (2017) 'Uji Fraksi Etil Asetat Daun *Peronema canescens* terhadap *Plasmodium berghei* pada *Mus musculus*', **Alotrop Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia**, 2(1), pp. 89–92.
- [21] Depkes RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, Cetakan Pertama. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Hal. 10- 12.
- [22] Harborne, J. B. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, tranlator. Bandung: ITB Press. 1987.
- [23] Setzer WN. 2008. Non-intercalative triterpenoid inhibitors of topoisomerase ii: a molecular docking study. **Compounds Journal** 1: 13-17.
- [24] Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacology Review** 52: 673–751.
- [25] Ahmad, Sjamsul. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta : Karunika jakarta Universitas Terbuka.
- [26] Harborne, J. B. 1996. Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, translated by K. Padmawirata. dan I. Soediro. ITB Press, Bandung.
- [27] Hanani E, Mun'im A, Sekarini R. 2005. Identifikasi senyawa antioksidan dalam spons *Callyspongia* sp. dari Kepulauan Seribu. **Majalah Ilmu Kefarmasian** 2(3): 127-133.
- [28] Raffauf, R.F., 1970, *A Handbook of Alkaloids and Alkaloid Containing Plants*, Willey-Interscience, New York.
- [29] Heyne, K., 1987, *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid 3, Departemen Kehutanan, Jakarta.
- [30] Topcu T, Ertasb A, Kolakb U, Öztürk M, Ulubelen A. 2007. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*. **ARKIVOC** 7: 195-208.
- [31] Abrosca BD, Fiorentino A, Monaco P, Oriano P, Pacifico S. 2006. Annurcoic acid: a new antioxidant ursane triterpene from fruits of cv. Annurca apple. **Food Chemistry** 98: 285–290.
- [32] Purnomo, Y., Soetmadji, D. W., Sumitro, S. B., Widodo, M. A. 2015. Anti-diabetic potential of *Urena lobata* leaf extract through inhibition of dipeptidyl peptidase IV activity. Malang; **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 5(8): 645-649.
- [33] Akhlaghi M, Bandy B. 2009. Review article: mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia– reperfusion injury. **Journal Molecular and Cellular Cardiology** 46: 309–317.
- [34] Atmani D, Chaheer N, Atmani D, Berboucha M, Debbache N, Boudaoud H. 2009. Flavonoids in human health: from structure to biological activity. **Current Nutrition and Food Science** 5:225-237.
- [35] Lu, Z., Nie, G., Belton, P. S., Tang, H., & Zhao, B. 2006. Structure–activity Relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives. **Neurochemistry International**, 48:263–274.
- [36] Jasson, N., 2005, The Determination of Total Phenolic Compounds in Green Tea, <http://folincioaltea/method/colorimetric>.
- [37] Berliansyah, S. Z., Dewi, A. R., & Purnomo, Y. 2021. Penentuan Kadar Fenol Total dan Aktivitas Antioksidan Fraksi N-butanol Daun Pulutan (*Urena lobata*). **Jurnal Biokomplemen Medicine**, 4(2).
- [38] Cahya, B. K., Fauziyah, S., & Purnomo, Y. 2021. Penentuan Kadar Total Fenolik dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Air Daun Pulutan (*Urena lobata L.*), **Jurnal Kedokteran Komunitas**, 10(1): 1–7.
- [39] Maiza-Benabdesselam, F., Khentache, S., Bougoffa, K., Chibane, M., Adach, S., Chapeleur, Y., Max, H, 2007. Antioxidant activities of alkaloid extract of two algerian species of *Fumaria*: *Fumariacapreolata* and *Fumariabastardii*. **Record. Nat. Prod.**1, 28-35.
- [40] Cui, Y., Kim, D.S., dan Park, K.C. 2004. Antioxidant Effect *Inonotus Obliquus*. **J Ethnopharmacol.** 96, 79-85.
- [41] Karadeniz F, Burdurlu HS, Koca N, Soyer Y. 2005. Antioxidant activity of selected fruits and vegetables grown in Turkey. **Turkish Journal Agriculture and Forestry** 89: 297–303.
- [42] Safitri, A. F., Widarti, H. R., & Sukarianingsih, D. 2018. Identifikasi Pemahaman Konsep Ikatan Kimia. **Jurnal Pembelajaran Kimia**, 3(1).
- [43] Winarsi, W., 2007, *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius, Yogyakarta, pp. 13,77.

- [44] Kuncahyo, I., dan Sunardi, 2007, Uji Aktivitas Ekstrak Belimbing Wuluh (*Averhoa bilimbi*, L.) terhadap DPPH, *SNT*, 1-9.
- [45] Molyneux, P. Original Article: The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, 2004, 26(2): 211-219.
- [46] Prakash, A., Rigelhof, F., & Miller, E., 2001, *Antioxidant Activity*, Medalliaon Laboratories, Vol 19 no : 2, 1-4.
- [47] Vermerris W, Nicholson R. Phenolic compound biochemistry. Netherlands: Springer; 2006.
- [48] Ghosh, D., and Konishi, T., 2007, Anthocyanins and Anthocyanin-Rich Extract : Role in Diabetes and Eye Function, Asia Pac, *J. Clin Nutr*, 16 (2), 200- 208.
- [49] Hoelz, L. V. B., B. A. C., Araujo, J. Q., Albuquerque, M.G., Alencastro, R. B., Silva, J. F. M., 2010, Quantitative Structure Activity Relationships of Antioxidant Phenolic Compounds, *J. Chem. Pharm. Res.*, 2 (5), 291-306.
- [50] Meiviani, R. P., Hidayah, F. K., & Purnomo, Y. 2021. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Fraksi n-Hexane Daun Pulutan (*Urena lobata*). **Jurnal Kedokteran Komunitas**, 10(1).