

## UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN SELADA MERAH (*Lactuca sativa* var. *acephala*) DENGAN MENGGUNAKAN 1,1-DIFENYL-2-PICRYLHYDRAZYL (DPPH)

Yahya Febrianto<sup>1)</sup>, Kiki Septiyani<sup>2)</sup>  
Akademi Farmasi Nusaputera Semarang<sup>1)2)</sup>  
Email: [yahyafebri15@gmail.com](mailto:yahyafebri15@gmail.com)

### ABSTRAK

Antioksidan adalah zat yang melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolic yang terjadi didalam tubuh. Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih electron kepada radikal bebas. Antioksidan bermanfaat untuk mencegah terjadinya stress oksidatif yang berperan penting dalam munculnya berbagai penyakit degenerative. Selada merah adalah salah satu sayuran yang mengandung pigmen antosianin sebagai sumber antioksidan serta memiliki banyak manfaat bagi kesehatan. Selada merah dengan kandungan antosianin yang tinggi akan menjadi pilihan sayur yang menyehatkan karena dapat menjadi antioksidan bagi tubuh. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (kamar). Cara mengekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebagai penyari. Pada uji fitokimia ekstrak dilakukan uji flavonoid berupa uji tabung dan KLT untuk mengetahui benar tidaknya senyawa flavonoid dalam daun selada merah yang berguna sebagai antioksidan alami pada tumbuhan. Pengukuran aktivitas antioksidan digunakan DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil) diukur dengan spektrofotometer UV- Vis pada panjang gelombang serapan maksimum  $\lambda$  517 nm. Uji aktifitas antioksidan dilakukan dengan pembanding vitamin C. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun selada merah mempunyai aktivitas penangkap radikal dengan  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration 50%) sebesar 126,91 ppm (sedang) sehingga, aktivitas penangkap radikal ekstrak etanol 96% daun selada merah lebih kecil daripada vitamin C dengan nilai sebesar 1,969 ppm (sangat kuat).

**Kata kunci:** Selada merah, antioksidan, flavonoid, DPPH

### PENDAHULUAN

Indonesia merupakan salah satu Negara yang kaya akan keanekaragaman hayati. Sumber hayati merupakan sumberdaya yang dibutuhkan untuk kehidupan manusia. Kekayaan jenis tumbuhan Indonesia berjumlah sekitar 37.000 spesies tumbuhan (Erdelen *et al.*, 1999) sebanyak 940 jenis tumbuhan telah terdaftar sebagai penyedia bahan ramuan untuk keperluan pengobatan secara tradisional (Bermawie *et al.*, 2005).

Keanekaragaman senyawa kimia untuk kebutuhan hidup manusia maupun organisme lain seperti untuk obat-obatan, insektisida, kosmetik dan sebagai bahan

dasar sintesa senyawa organic yang lebih bermanfaat. Keanekaragaman senyawa kimia pada sumber daya alam hayati memiliki banyak nilai positif, misalnya kandungan senyawa vitamin C pada buah jeruk bermanfaat sebagai antioksidan yang mencegah dan menghambat pertumbuhan sel kanker (Silalahi, 2006).

Antioksidan adalah zat yang melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas yang terbentuk sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil dari reaksi-reaksi kimia dan proses metabolic yang terjadi didalam tubuh. Berbagai bukti ilmiah menunjukkan bahwa senyawa antioksidan mengurangi resiko terhadap

penyakit kronis, seperti kanker dan penyakit jantung koroner (Amrum *et al*, 2007).

Antioksidan bermanfaat untuk mencegah terjadinya stress oksidatif yang berperan penting dalam munculnya berbagai penyakit degenerative. Sehingga antioksidan didalam tubuh perlu untuk ditingkatkan dan hal ini dapat dilakukan dengan meningkatkan konsumsi antioksidan alami seperti sayuran. Sumber antioksidan pada sayuran salah satunya adalah antosianin. Antosianin merupakan pigmen berwarna merah, ungu dan biru. Antosianin diyakini mempunyai efek antioksidan yang sangat baik (Winarno, 1997). Pigmen antosianin dapat mengurangi resiko penyakit jantung koroner, resiko stroke, aktivitas antikarsinogen, efek anti-inflamatory serta memperbaiki ketajaman mata (Ariviani, 2010).

Salah satu metode uji untuk menentukan aktivitas antioksidan adalah metode DPPH. DPPH adalah suatu radikal bebas yang stabil pada suhu kamar, dan sering digunakan untuk menilai aktivitas antioksidan beberapa senyawa atau ekstrak bahan alam. Interaksi antioksidan terhadap DPPH baik secara transfer elektron atau senyawa hidrogen pada DPPH. Prinsip uji DPPH adalah mengukur terjadinya pemudaran warna dari radikal DPPH akibat adanya antioksidan yang dapat menetralkan molekul radikal bebas. Jadi, radikal DPPH yang sebelumnya berwarna akan kehilangan warnanya jika ada antioksidan, karena antioksidan akan menyumbangkan elektronnya kepada radikal DPPH, sehingga radikal yang sebelumnya tidak stabil (akibat adanya elektron yang tidak berpasangan) menjadi stabil (electron di radikal bebas kini menjadi berpasangan karena mendapat sumbangan electron dari antioksidan). Penghilangan warna untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung menjangkau radikal DPPH dengan pemantauan absorbansi pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer. Radikal DPPH dengan nitrogen organik terpusat adalah radikal bebas stabil berwarna ungu gelap yang

direduksi menjadi bentuk non radikal oleh antioksidan menjadi warna kuningan (Molyneux, 2003).

## METODE PENELITIAN

### Alat

Moisture balance (Ohaus), botol kaca, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), rak tabung, kertas saring, mesh 100, blender, neraca analitik, beaker glass, batang pengaduk, cawan porselen, tabung reaksi, pipet tetes, mikropipet (Socorex).

### Bahan

Daun Selada Merah (*Lactuca sativa* var. *acephala*), serbuk magnesium, asam klorida, etanol 96%, amil alcohol, NaOH, HCl pekat, n-butanol, asam asetat, methanol p.a, larutan DPPH, vitamin C, dan aquadest.

### Pengambilan Bahan Baku

Penelitian dilaksanakan pada bulan April – Mei 2018 di Laboratorium Kimia Akademi Farmasi Nusaputera Semarang. Bahan baku selada merah diambil dari daerah Green House Hidroponik Agrofarm Bandungan, Kabupaten Semarang. Pengambilan selada merah dilakukan secara acak.

### Ekstraksi Bahan Aktif

Tahap ekstraksi terdiri dari persiapan sampel dan ekstraksi bahan aktif. Pada tahap persiapan bahan sampel, Selada merah dicuci dengan air bersih dilanjutkan dengan dibilas dengan aquadest untuk menghilangkan kotoran. Daun kemudian dipotong-potong, kemudian dilanjutkan dikeringkan dengan panas sinar matahari dengan ditutupi kain hitam selama 5 hari (Quinn, 1988). Daun kering kemudian diblender sehingga didapat tekstur yang halus. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi.

Sampel sebanyak 250 gram dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 2,5 L selama 120 jam. Hasil maserasi yang berupa larutan kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrate

yang diperoleh dipiekatkan diatas waterbath hingga diperoleh ekstrak etanol daun selada merah.

### Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun selada merah dilakukan dengan metode DPPH (Blois, 1958). Ekstrak hasil maserasi dilarutkan dengan methanol p.a dengan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm dan 100 ppm. Antioksidan vitamin C digunakan sebagai pembanding dan control positif dibuat dengan cara dilarutkan dalam pelarut methanol dengan konsentrasi 0,2 ppm, 0,3 ppm, 0,4 ppm, 0,5 ppm dan 0,6 ppm. Larutan DPPH dibuat dalam kondisi suhu rendah dan terlindung dari cahaya matahari, dengan menggunakan kristal DPPH dalam pelarut methanol p.a dengan konsentrasi 0,4 mM. Larutan ekstrak dan larutan antioksidan pembanding vitamin C diambil 4 ml dari larutan sampel yang dicampur dengan 4 ml larutan stok DPPH 0,4 mM dan ditempatkan dalam tabung reaksi kedap cahaya. Kemudian di inkubasi selama 5 menit dan 30 menit.

Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm tanpa sampel sebagai blanko. Absorbansi atau serapan cahaya dari pengukuran secara spektrofotometri UV-Vis dihitung persen peredamannya yaitu :

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{A \text{ blanko} - A \text{ sampel}}{A \text{ blanko}}$$

Keterangan :

A blanko = Absorbansi blanko x 100%

A sampel = Absorbansi sampel

Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  dari masing-masing sampel dinyatakan dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  menyatakan besarnya konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk mereduksi radikal bebas DPPH sebesar 50% dibanding control melalui suatu persamaan garis linier.

$$\text{Nilai } IC_{50} : Y = bx + a$$

Keterangan :

X = nilai dari  $IC_{50}$

Y = 50

a = slope

b = intercept

### UJI KUALITATIF

#### Uji Flavonoid

##### a. Uji NaOH 10%

Ekstrak didalam tabung reaksi ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 10%. Hasil positif jika larutan berubah warna menjadi kuning, merah, coklat dan hijau (Harbone, 1987).

##### b. Uji Bate-Smith

Isolat ditambahkan HCl pekat lalu dipanaskan dengan waktu 15 menit di atas penangas air. Reaksi positif jika memberikan warna merah (Achmad, 1986).

##### c. Uji Wilstatter

Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid sejumlah sampel ditambahkan 0,05 g serbuk magnesium dan 0,2 ml asam alcohol (campuran asam klorida 37% dan etanol 95% dengan volume yang sama), lalu ditambahkan 2 ml amil alkohol. Kemudian campuran dikocok. Adanya flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah atau kuning pada lapisan amil alkohol (Bintang, 2010).

#### Analisis Kromatografi Lapis Tipis

Filtrat etanol daun selada merah pada skrining fitokimia ditotolkan pada plat silika gel GF 254. Sebelum dilakukan penotolan sampel, fase diam atau silica gel harus diaktifkan dengan cara dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu  $110^{\circ}C$  selama 15 menit. Dielusi dengan n-butanol : asam asetat : air (4 : 5 : 1), kemudian dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya plat disemprot dengan amonia, dikeringkan dan diamati kembali pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### Rendemen

Hasil randemen yang didapat dari proses maserasi didapat ekstrak kental sebanyak 8,4 %. Kemurnian pelarut sangat mempengaruhi besar senyawa yang terlarut, semakin besar kadar pelarut, semakin besar pula kadar senyawa yang didapat.

Selai

n dipengaruhi oleh komponen-komponen dalam sampel, ukuran sampel juga merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi hasil rendemen. Menurut Sembiring *et al.* (2006), semakin halus bahan yang digunakan semakin tinggi rendemen yang dihasilkan. Perbesaran luasan permukaan bertujuan untuk mempercepat pelarutan, mempercepat reaksi kimia, dan mempertinggi kemampuan penyerapan (Bernasconi *et al.*, 2008). Penggunaan pelarut yang berbeda tingkat kepolaran mempengaruhi jenis senyawa yang terekstrak (Soeksmanto *et al.*, 2007).

### Uji Kualitatif

Identifikasi zat aktif dilakukan pada sampel ekstrak etanol daun selada merah dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam pada kromatografi lapis tipis menggunakan fase diam lempeng silika gel GF 254 karena fase diam ini dapat digunakan sebagai fase polar maupun non polar. Sifat dari silika gel adalah sedikit asam, sehingga dapat menahan senyawa aktif ekstrak yang bersifat basa, sedangkan senyawa aktif yang bersifat asam akan dapat terelusi dengan cepat melewati fase diam. Kekuatan elusi dari adsorben dipengaruhi oleh polaritas zat yang terlarut pada fase gerak. Sebelum dilakukan penotolan sampel, fase diam atau silika gel harus diaktifkan dengan cara dipanaskan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 110°C selama 15 menit. Hal ini bertujuan untuk meningkatkan daya absorpsi dari fase diam dan untuk mengurangi kelembapan dan mengeringkan molekul air yang menempati pusat-pusat serapan dan penyerap fase diam yang dapat menimbulkan berbagai masalah pada proses elusi karena dapat terjadi deaktivasi.

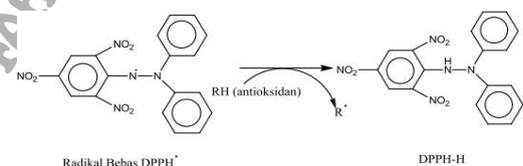
Hasil yang didapatkan pada pengujian KLT terdapat senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun selada merah setelah disemprot dengan amonia, dengan harga R<sub>f</sub> dari noda pertama sebesar 0,92. Noda kedua memiliki harga R<sub>f</sub> sebesar 0,73 dan noda ketiga memiliki nilai R<sub>f</sub> 0,46 yang berwarna kuning muda dan kuning setelah disemprot dengan

ammonia pada pengamatan dengan sinar tampak yang menegaskan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak etanol daun selada merah. Hasil uji KLT menegaskan bahwa dalam sampel ekstrak etanol daun selada merah mengandung flavonoid.

Pada identifikasi flavonoid dengan reaksi warna dari ekstrak daun selada merah menggunakan uji NaOH %, uji *Bate-Smith* dan Uji *Wilstatter* menunjukkan hasil positif. Pada uji NaOH 10% dihasilkan warna hijau, untuk uji *Bate-Smith* dihasilkan warna merah, sedangkan pada uji *Wilstatter* dihasilkan dengan terbentuknya warna merah atau kuning pada lapisan amil alcohol.

### Aktivitas Antioksidan

DPPH merupakan radikal bebas yang stabil karena delokalisasi elektron di seluruh molekul sehingga terjadi dimerisasi yang menjadi masalah untuk radikal bebas lainnya. Ketika DPPH dicampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, terjadi peningkatan bentuk tereduksi dari DPPH yaitu 1,1-diphenyl-2-piclylhydrazyl yang mengakibatkan hilangnya warna ungu dan berubah menjadi terbentuk warna kuning pucat.



Gambar 1. Reaksi antara DPPH dengan antioksidan membentuk DPPH-H

Metode DPPH memberikan informasi reaktifitas senyawa yang di uji dengan suatu radikal stabil. Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang kemudian menyebabkan penghilangan warna yang sebanding dengan jumlah electron yang diambil (Sunarni, 2005). Kemampuan penangkapan radikal DPPH oleh suatu antioksidan dinyatakan dengan nilai persen penangkapan radikal. Nilai yang semakin tinggi menunjukkan bahwa sampel senyawa yang digunakan memang berpotensi sebagai antioksidan

(Ridwana, 2008). Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun selada merah menunjukkan nilai absorbansi yang menurun seiring dengan naiknya konsentrasi sampel. Semakin tinggi konsentrasi sampel maka peluruhan warna ungu violet DPPH dalam metanol semakin tinggi.

Antioksidan vitamin C digunakan sebagai pembanding dan kontrol positif. Parameter yang umum digunakan untuk menginterpretasikan hasil pengujian DPPH adalah  $IC_{50}$ . Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi (Molyneux, 2004). Hasil uji aktivitas antioksidan vitamin C dan ekstrak etanol daun selada merah disajikan pada tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan**

Sampel	Kons (ppm)	% inhibisi	$IC_{50}$
Ekstrak	20	76,4%	126,91
Etanol	40	80,9%	
Daun	60	85,17%	
Selada	80	88,11%	
Merah	100	91,2%	
Vitamin C	0,2	84,01%	1,969
	0,3	86,15%	
	0,4	87,32%	
	0,5	88,49%	
	0,6	90,72%	

Persen inhibisi tertinggi selalu dihasilkan oleh larutan yang mengandung konsentrasi terbanyak yaitu larutan dengan konsentrasi 100 ppm. Sementara persen inhibisi terendah dihasilkan dengan konsentrasi 20 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak selada merah yang ditambahkan, maka semakin tinggi pula persen inhibisi yang dihasilkan (Hanani et al, 2005).

Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol daun selada merah berdasarkan hasil

perhitungan yang didapat adalah sebesar 126,91 ppm (sedang) dan dari hasil perhitungan didapat nilai  $IC_{50}$  vitamin C adalah 1,969 ppm (sangat kuat). Menurut Molyneux (2004), bahwa suatu zat mempunyai sifat antioksidan bila nilai  $IC_{50}$  yang diperoleh berkisar antara 200-1000  $\mu\text{g/mL}$ , dimana zat tersebut kurang aktif namun masih berpotensi sebagai zat antioksidan. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50 ppm, kuat untuk  $IC_{50}$  bernilai 50-100 ppm, sedang jika  $IC_{50}$  bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika  $IC_{50}$  bernilai 151-200 ppm (Mardawati et al., 2008).

### KESIMPULAN

1. Terdapat senyawa flavonoid pada ekstrak etanol selada merah (*Lactuca sativa* var. *acephala*) hal ini dapat dilihat dari hasil uji pendahuluan secara KLT dimana bercak yang dihasilkan ketika disemprot dengan pereaksi amonia warna bercak tersebut berubah menjadi kuning.
2. Aktivitas antioksidan antara ekstrak etanol daun selada merah dengan kontrol positif vitamin C dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol daun selada merah adalah 126,91 ppm sedangkan nilai  $IC_{50}$  vitamin C adalah 1,969 ppm, sehingga ekstrak etanol selada merah memiliki aktivitas antioksidan yang sedang bila dibandingkan dengan vitamin C yang memiliki kekuatan sangat kuat dalam menghambat radikal bebas DDPH.
3. Kadar yang didapat dari hasil metode DPPH ekstrak etanol selada merah (*Lactuca sativa* var. *acephala*) yaitu Nilai  $IC_{50}$  Ekstrak etanol daun selada merah adalah 126,91 ppm (sedang).

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karunika.
- Amrum, M.H., & Umiyah. 2005. Pengujian antiradikal bebas difenilprikil hidrazil (DPPH) ekstrak buah kenitu (*Chrysophyllum cainito* L.) dari daerah sekitar Jember. *J. Ilmu Dasar*, 6(2):110-114.
- Ariviani, S. 2010. Kapasitas Antiradikal Ekstrak Antosianin Buah Salam (*syzygium polyanthum* [Wight.] Walp) Segar dengan Variasi Proporsi Pelarut. *Caraka Tani*, 25(1) : 23-30.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga, 255 hlm.
- Bermawie, N., Hernani, Suwijyo P. And Kardono, L.B.S. 2005. Approaches For Sustainable Utilization of Biodiversity of Medicinal and Aromatic Plants in Indonesia. <http://dbp.gov.my/mab2005/>.
- Bernasconi, G. Gerster, H. Hauser, H. Stauble, H. Schneifer, E. 2008. *Teknologi Kimia. Bagian 2*. penerjemah : Handojo L. Pradnya Paramita. Jakarta. Hal 177-185.
- Erdelen W. R., Adimihardja, K., Moesdarsono, and Sidik, H. (1999). Biodiversity, traditional medicine and the sustainable use of indigenous medicinal plants in Indonesia. *Indigenous Knowledge and Development Monitor* 7, 3-6
- 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.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan kedua. Penerbit ITB bandung.
- Mardawati, E., F. Filianty dan H. Harta. 2008. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. Hal. 4.
- Molyneux, P. 2003. The use of the stable free radikal diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journal Science of Technology*. 26(2):211-219.
- Ridwana, G. 2008. Perbandingan Pengukuran Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Minyak Atsiri Lempuyang Gajah. Skripsi FMIPA IPB. Bogor.
- Sembiring, B.B., Ma'mun dan E.I. Ginting. 2006. Pengaruh Kehalusan Bahan dan Lama Ekstraksi Terhadap Mutu Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb). *Bul. Littro* 17: 53 – 58.
- Silalahi, J. 2006. Antioksidan dalam Diet dan Karsinogenesis. *Cermin Dunia Kedokteran*, 153:39-42.
- Soeksmanto, A., Hapsari, Y. & Simanjuntak, P., 2007. Kandungan Antioksidan pada Beberapa Bagian Tanaman Mahkota Dewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymelaceae), *Biodiversitas*, 8(2), 92-95.
- Sunarni, T., 2005. Aktivitas Antioksidan Penangkap Radikal Bebas Beberapa kecambah Dari Biji Tanaman Familia Papilionaceae, *Jurnal Farmasi Indonesia*, 2(2), 53-61.
- Winarno FG. 1997. *Kimia Pangan dan Gizi*. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.