AKTIVITAS ANTIOKSIDAN HASIL KROMATOGRAFI VAKUM CAIR FRAKSI METANOL KULIT BATANG CERIA (*Baccaurea hookeri*)

JP Maro[1*], Andi Hairil Alimuddin[1], Harlia[1]
[1]Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, UniversitasTanjungpura,
Jln. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi 78124, Pontianak
*Email: jpmaro25@gmail.com

ABSTRAK

Fraksi metanol kulit batang ceria (Baccaurea hookeri) telah diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi metanol kulit batang ceria hasil kromatografi vakum cair (KVC). Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi metanol memiliki kemampuan menghambat radikal bebas DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 9,265 µg/mL. Hasil uji fitokimia menunjukkan fraksi metanol hasil KVC mengandung golongan senyawa polifenol dan terpenoid. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi metanol kulit batang ceria hasil KVC berpotensi kuat sebagai antioksidan, namun masih lebih rendah dibandingkan asam askorbat yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 6,607 µg/mL.

Kata kunci: Ceria (Baccaurea hookeri), antioksidan, polifenol, terpenoid

PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan substansi yang diperlukan tubuh untuk menetralisir radikal bebas dan mencegah kerusakan sel, protein dan lemak. Antioksidan berperan dalam meredam efek radikal bebas yang berkaitan erat dengan terjadinya penyakit degeneratif seperti tekanan darah tinggi, jantung koroner, diabetes dan kanker (Wang, *et al.*, 1989). Antioksidan berdasarkan sumbernya dikelompokkan menjadi antioksidan alami dan antioksidan sintetik. Antioksidan alami lebih diminati dibandingkan antioksidan sintetik karena antioksidan sintetik seperti butil hidroksitoluen (BHT) diketahui dapat meningkatkan terjadinya efek karsinogenik (Umemura, *et al*., 2001)

Tumbuhan yang berpotensi sebagai sumber antioksidan alami salah satunya adalah genus *Baccaurea*. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa beberapa spesies *Baccaurea* memiliki potensi sebagai sumber antioksidan alami. Daging buah *Baccaurea macrocarpa* (tampoi) mengandung senyawa kimia golongan saponin, alkaloid dan flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} 33,11 µg/mL (Tirtana., 2013). Selain itu, ekstrak buah *Baccaurea angulata* (belimbing dayak) mengandung senyawa fenolik dan flavonoid. Hasil uji antioksidan pada buah, daging buah dan kulit buah belimbing dayak dengan metode DPPH berturut-turut menunjukkan nilai IC_{50} 53,68 µg/mL, 46,23 µg/mL dan 78,54 µg/mL (Jauhari, *et al.,* 2013)

Ceria (*Baccaurea hookeri*) merupakan salah satu spesies dari genus *Baccaurea* yang memiliki potensi sebagai sumber antioksidan. Tanaman ceria banyak terdapat di daerah Kalimantan Barat yang tanahnya rawa di daerah lereng perbukitan di kecamatan Batang Tarang. Panjaitan (2014) menyatakan bahwa ekstrak dan fraksi metanol kulit batang ceria mengandung senyawa golongan alkaloid, flavonoid, polifenol dan steroid. Uji aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi menunjukan nilai IC_{50} ekstrak metanol sebesar 56,47 µg/ml, fraksi n-heksan sebesar 68,07 µg/ml, fraksi kloroform sebesar 82,68 µg/ml, fraksi etil asetat sebesar 59,57 µg/ml dan fraksi metanol sebesar 29,88 µg/ml.

Penelitian yang dilakukan Panjaitan (2014) hanya sebatas penentuan aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi. Oleh karena itu dilakukan penelitian mengenai penentuan aktivitas antioksidan dan penentuan golongan senyawa kimia fraksi metanol hasil kromatografi vakum cair (KVC).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah corong pisah, Erlenmeyer, labu ukur, *rotary evaporator*, seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT), seperangkat alat kromatografi vakum cair (KVC) dan spektrofometer UV/Vis.

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini antara lain akuades (H_2O), asam askorbat, asam klorida (HCl), asam sulfat (H_2SO_4), besi (III) klorida ($FeCl_3$), etil asetat (CH_3COOCH_3), logam magnesium (Mg), n- heksan (C_6H_{14}), metanol (CH_3OH), 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil (DPPH), plat KLT, silika gel 60 F_{254}, pereaksi Dragendrof, pereaksi Meyer, pereaksi Wagner dan Sampel kulit batang ceria.

Cara Kerja

Sampling dan Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang ceria (*Baccaurea hookeri*) yang berasal dari daerah Batang Tarang, Kabupaten Sanggau, Kalimantan Barat. Sampel dikeringkan dan dibersihkan lalu dipotong kecil dan kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk halus.

Serbuk kering kulit batang ceria dimaserasi dengan pelarut metanol pada suhu ruang. Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam. Ekstrak kemudian disaring sehingga didapatkan filtrat dan residu, kemudian residu dimaserasi kembali dengan metanol sampai didapatkan larutan filtrat yang jernih. Selanjutnya filtrat dievaporasi dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 30-45°C dan kecepatan putaran 60-90rpm sehingga didapatkan ekstrak kental metanol. Ekstrak kental metanol kemudian dilakukan fraksinasi dengan pelarut metanol, n-heksan dan etil asetat sehingga didapatkan fraksi metanol, fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat.

Pemisahan Fraksi Metanol dengan Kromatografi Vakum Cair

Fraksi metanol dianalisis menggunakan KLT dengan kombinasi pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda. Hasil analisis KLT dengan pemisahan terbaik digunakan sebagai eluen pada proses KVC.

Fraksi metanol diimpregnasi dengan silika gel dan dimasukkan ke dalam kolom dan dipadatkan. Kolom kromatografi dielusi bergradien dengan menggunakan eluen campuran n-heksana : etil asetat dan campuran etil asetat : metanol hasil analisis KLT. Eluat hasil pemisahan dengan KVC ditampung didalam botol kaca yang kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator*.

Fraksi-fraksi dilakukan analisis pola pemisahan dan sebaran komponen senyawanya menggunakan metode KLT. Kromatogram dikeringkan dan disemprot dengan larutan DPPH 2 mM. Kromatogram diamati setelah 30 menit dan fraksi aktif antioksidan ditunjukkan dengan noda kuning berlatar ungu (Chaca, *et al*., 2003).

Skrining fitokimia

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder fraksi hasil kromatografi vakum cair, seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, saponin dan steroid/terpenoid pada tumbuhan ceria (Harbone, 1987)

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan metode penangkapan radikal bebas DPPH. Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode yang digunakan dalam penelitian Setyaningsih (2003). Fraksi yang diperoleh dari hasil pemisahan kromatografi vakum cair dibuat dalam konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm sebanyak 1 mL ditambahkan 3 mL DPPH 0,4 mM dalam metanol. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruang gelap agar reaksi sempurna. Selanjutnya campuran diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Hasil pengukuran antioksidan dibandingkan dengan asam askorbat. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengulangan dan Perhitungan aktivitas penangkap radikal DPPH dihitung berdasarkan persamaan berikut:

$$\%\ Inhibisi = \frac{(Absorbansi_{kontrol} - Absorbansi_{sampel})}{Absorbansi_{kontrol}} x100\%$$

Hasil pengukuran diinterpretasikan ke dalam grafik hubungan konsentrasi terhadap persen peredaman dan dibandingkan dengan asam askorbat. Persamaan garis yang diperoleh digunakan untuk mencari

nilai IC_{50}, yaitu konsentrasi yang diperlukan untuk mereduksi 50% radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan y = ax + b pada kurva regresi linear hubungan konsentrasi (x) dan persentase pererdaman (y). Nilai IC_{50} dikatakan aktif sebagai antioksidan jika memiliki IC_{50} < 200 µg/ml (Kresnawaty dan Zainuddin, 2009).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

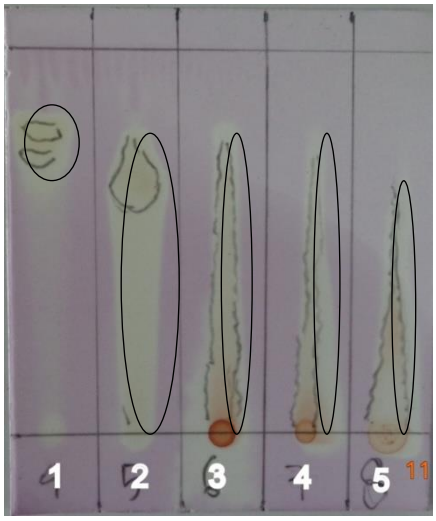
Sampel kering sebanyak 1 kg dimaserasi menggunakan pelarut metanol. Pemilihan metanol yaitu karena mempunyai kepolaran yang tinggi sehingga dapat melarutkan senyawa polar, semipolar maupun non polar dalam sampel. Selain itu, jika dibandingkan dengan pelarut air, metanol lebih unggul karena lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan bakteri, tidak beracun, netral, serta absorbsinya baik dan panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit (Tian and White, 1994). Metanol dapat mengekstrak golongan senyawa antioksidan seperti alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid dan terpenoid. Proses maserasi sampel dilakukan berulang selama 3x24 jam. Pemekatan maserat hasil maserasi sampel dilakukan dengan alat *rotary evaporator* pada suhu 30-45°C dan kecepatan putaran 60-90rpm sehingga diperoleh ekstrak kental kulit batang ceria dengan massa 58,265 g yang berwarna merah tua kecoklatan.

Ekstrak kasar yang terdiri dari campuran komponen fraksi polar, semipolar dan nonpolar dipisahkan dengan cara fraksinasi menggunakan pelarut dengan tahap tingkat kepolaran. Ekstrak kasar kulit batang ceria terlebih dahulu dilarutkan dengan pelarut metanol yang berifat polar yang kemudian dimasukkan ke dalam pelarut n-heksan yang bersifat non polar dengan dilakukan pengocokan. Proses fraksinasi ini dilakukan berulang sampai didapatkan pelarut n-heksan berwarna bening yang menandakan bahwa tidak ada lagi komponen sampel yang terlarut kedalam pelarut n-heksan. Selanjutnya, fraksi metanol difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat yang bertujuan untuk memisahkan komponen semi polar yang tidak terlarut dalam pelarut n-heksan.

Pemisahan Fraksi Metanol dengan Kromatografi Vakum Cair (KVC)

Pemisahan fraksi metanol dilakukan dengan metode kromatografi vakum cair. Prinsip kerja KVC adalah partisi dan adsorpsi komponen senyawa yang pemisahannya dibantu dengan tekanan dari alat vakum. Pemisahan fraksi metanol pada penelitian ini yaitu bertujuan untuk menentukan subfraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi. Elusi fraksi metanol dilakukan dengan variasi eluen yang bergradien.

Eluat hasil KVC I diperoleh 5 subfraksi yang kemudian dipekatkan dengan alat *rotary evaporator.* Uji kualitatif antioksidan dilakukan dengan penyemprotan DPPH 0,2 mM (Chaca, *et al.,* 2003). Pengujian antioksidan secara kualitatif pada subfraksi 1-5 hasil KVC I bertujuan untuk mengetahui sifat antioksidan dari masing-masing subfraksi. Hasil uji menunjukkan subfraksi 1-5 hasil KVC I aktif bersifat antioksidan yang ditandai dengan timbulnya noda kuning berlatar ungu pada plat kromatogram (Gambar 1).



Gambar 1. Kromatogram penampakan noda dengan DPPH 0,2 mM

Fraksi gabungan V_2 memiliki wilayah sebaran noda dengan intensitas warna kuning yang lebih tinggi dan massa lebih besar dibandingkan fraksi gabungan V_1 dan V_3. Wilayah sebaran noda dan intensitas warnanya menunjukkan fraksi V_2 memiliki aktivitas antioksidan tertinggi. Hasil kromatogram KLT menunjukkan pola noda yang menyebar yang menunjukkan bahwa subfraksi pada fraksi gabungan V_2 yang

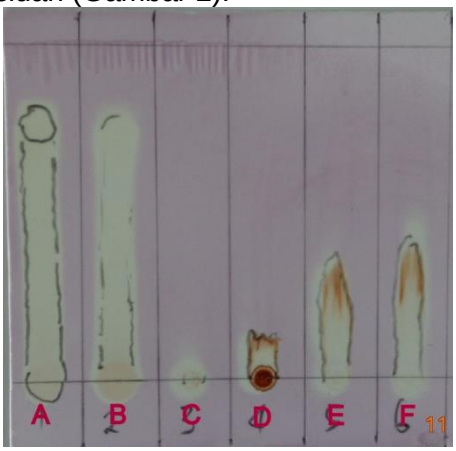
dihasilkan masih belum murni, sehingga fraksi gabungan V_2 dilakukan fraksinasi kembali.

Tabel 1. Fraksi gabungan hasil KVC 1

Fraksi Gabungan	Subfraksi	Massa (gr)	Aktivitas Antioksidan
V_1	1	0,549	+
V_2*	2-4	1,663	++
V_3	5	0,080	+

Keterangan: * : fraksi yang diteruskan untuk dilakukan fraksinasi dengan KVC II
(+) : mempunyai sifat antioksidan berdasarkan analisis KLT dengan reagen semprot DPPH 2%
(++) : mempunyai sifat antioksidan lebih besar yang ditandai dengan luas noda lebih besar

Fraksi gabungan V_2 dilakukan fraksinasi KVC II. Eluat hasil KVC II diperoleh 6 subfraksi. Kromatogram hasil uji kualitatif antioksidan pada subfraksi hasil KVC II menunjukkan subfraksi A-F aktif bersifat antioksidan (Gambar 2).



Gambar 2. Kromatogram penampakan noda subfraksi hasil KVC II dengan DPPH 0,2 mM

Hasil kromatogram KLT dan semprot DPPH 0,2 mM yang diperoleh menunjukkan bahwa fraksi gabungan $V_{2.1}$ memiliki pola sebaran noda dan intensitas warna kuning yang lebih tinggi dibandingkan fraksi $V_{2.2}$ – $V_{2.5}$. Berdasarkan pola kromatogram yang menyebar diketahui subfraksi $V_{2.1}$ masih belum murni.

Tabel 2. Hasil subfaksi KVC II

Fraksi Gabungan	Subfraksi	Massa (gr)	Aktivitas Antioksidan
$V_{2.1}$*	A-B	0,243	++
$V_{2.2}$	C	0,046	+
$V_{2.3}$	D	0,026	+
$V_{2.4}$	E	0,014	+
$V_{2.5}$	F	0,017	+

Keterangan : (*) = Fraksi yang diteruskan untuk dilakukan uji aktivitas antioksidan
(+) = mempunyai sifat antioksidan berdasarkan analisis KLT dengan reagen semprot DPPH 2%
(++) = mempunyai sifat antioksidan lebih besar yang ditandai dengan luas noda lebih besar

Skrining Fitokimia

Uji fitokimia merupakan metode pendekatan yang digunakan dalam menentukan keberadaan golongan senyawa metabolit sekunder pada senyawa uji. Metabolit sekunder yang bertindak sebagai antioksidan diantaranya alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid dan terpenoid. Golongan senyawa antioksidan ditentukan dengan melihat adanya perubahan warna, pengendapan maupun pembentukan busa (Harbone., 1987).

Tabel 3. Skrining fitokimia fraksi metanol $V_{2.1}$* hasil KVC II

No	Kandungan kimia	Hasil
1	Alkaloid	-
2	Flavonoid	-
3	Polifenol	+
4	Steroid	-
5	Terpenoid	+

Keterangan: (+) : Positif mengandung senyawa
(-) : Tidak mengandung senyawa

Data skrining fitokimia menunjukkan bahwa golongan senyawa kimia yang terdapat pada fraksi metanol $V_{2.1}$* hasil KVC II kulit batang ceria yaitu polifenol dan terpenoid sedangkan kandungan alkaloid, flavonoid dan steroid tidak terdeteksi pada uji ini. Golongan senyawa alkaloid, flavonoid dan steroid terpisah didalam fase gerak

pada proses pemisahan dengan KVC sehingga hanya polifenol dan terpenoid yang keluar bersama fase gerak. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa pada fraksi metanol $V_{2.1}$* hasil KVC II lebih murni dibandingkan dengan data penelitian yang dilaporkan oleh panjaitan (2014) pada hasil skrining fitokimia fraksi metanol tanpa KVC yang mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid dan terpenoid. Hal ini menunjukkan bahwa golongan senyawa kimia yang lebih aktif berperan sebagai antioksidan pada fraksi metanol kulit batang ceria adalah polifenol dan terpenoid.

Pengujian Aktivitas Menggunakan Metode DPPH

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH berdasarkan pada kemampuan substansi antioksidan dalam menetralisir radikal bebas DPPH. Interaksi senyawa antioksidan dengan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) baik secara transfer elektron maupun radikal hidrogen akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH sehingga tereduksi menjadi DPPH-H (1,1-difenil-2-pikrilhidrazin) yang ditandai dengan perubahan warna larutan ungu tua dari DPPH menjadi kuning (Molyneux, 2004).

Tabel 4. Nilai IC_{50} kemampuan menangkap radikal DPPH

Komponen	IC_{50} (ppm)
Fraksi	15,581
Fraksi $V_{2.1}$	9,265
Asam askorbat	6,607

Keterangan :
Fraksi : Fraksi metanol sebelum dilakukan KVC
Fraksi $V_{2.1}$: Fraksi metanol setelah dilakukan KVC

Aktivitas antioksidan fraksi metanol hasil KVC dinyatakan dengan nilai IC_{50}. Nilai IC_{50} menyatakan besarnya konsentrasi sampel yang mampu menghambat aktivitas radikal DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} menunjukkan aktivitas antioksidan semakin tinggi (Molyneux, 2004). Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada fraksi metanol sebelum dilakukan pemisahan dan subfraksi $V_{2.1}$ hasil pemisahan dengan metode KVC dan asam askorbat sebagai pembanding.

Suatu zat dikatakan dikatakan antioksidan sangat kuat apabila nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat apabila nilai IC_{50} antara 50-100 ppm, sedang apabila nilai IC_{50} antara 100-200 ppm (Molyneux, 2004). Berdasarkan hasil perhitungan, aktivitas antioksidan fraksi $V_{2.1}$ menunjukkan aktivitas yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 9,265 ppm. Asam akorbat yang digunakan sebagai pembanding memiliki IC_{50} sebesar 6,607 ppm. Hasil ini menunjukkan bahwa fraksi metanol dan fraksi $V_{2.1}$ memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat, tetapi aktivitas antioksidan fraksi metanol dan fraksi $V_{2.1}$ lebih lemah jika dibandingkan dengan asam askorbat.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dalam penelitian ini, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Aktivitas antioksidan fraksi metanol hasil pemisahan dengan metode kromatografi vakum cair memiliki kemampuan menghambat radikal DPPH dengan nilai IC_{50} sebesar 9,265 µg/mL
2. Fraksi metanol hasil pemisahan dengan metode kromatografi vakum cair mengandung senyawa golongan polifenol dan terpenoid.

DAFTAR PUSTAKA

Chaca, M., Moleta, G.B., and Majinda, R.R.T., 2003, Antimycrobial and Radical Scavenging Flavonoids from the Stem Wood of *Erythrina latissima* Phytochemistr*y*, 66,99-104.

Harbone, J.B., 1987, Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua, AB: Kosasih Padmawinata dan Iwang Sudiro, ITB, Bandung.

Jauhari, N.K., Ibrahim, D., Ibrahim, M., Nor, M., Yahya, A., Nor, N.M., Isa, K.A., Ayob, M.K., 2013, Komposisi Proksimat dan Aktivitas Antioksidan dari Belimbing Dayak (*Baccaurea angulata*), *Sains Malaysiana* 42(2): 129-134.

Kresnawaty, I dan Zainuddin, A, 2009, Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri dari Derivat Metil Ekstrak Etanol Daun Gambir (*Uncaria gambir*), *J. Litri*, 15(4): 145-151.

Molyneux, P., 2004, The Use of Stable Free Radical Diphenyl-picrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Tecnol*, 26 (2): 211-219.

Panjaitan, M.P., 2014, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Metanol
Kulit Batang Ceria *(Baccaurea hookeri)*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak, (Skripsi).

Setyaningsih, A., 2003, Studi Pendahuluan Bahan Aktif dari Bintang Laut (*Astropecten* sp.) sebagai Antioksidan (Skripsi), Bogor, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor.

Tian, L.L and White, P.J., 1994, Antioxidant Activity of Oat Extract Inhibitor Tripsin Soybean and Cotton Seed Oils, *J. AOCS*, 71: 647-652.

Tirtana, E.,2013, Analisa Proksimat, Uji Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Pada Buah Tampoi (*Baccaurea Macrocarpa*), Fakultas Matematikadan Ilmu Pengetahuan Alam,Universitas Tanjungpura, Pontianak, (Skripsi).

Umemura, T., Kodama, Y., Hioki, K., Inoue, T., Nomura, T., Kurokawa, T., 2001, Butylhydroxytoluene (BHT) Increases Susceptibility of Transgenic rasH_2 Mice to Lung Carcinogenesis, *J Cancer Res Clin Oncol*, 127(10): 583-590.

Wang, Z.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R., Bickers, H., and Mukhtar, M., 1989, Antimutagenic Activity og Green Tea polyphenols, *Mutation res*, 223: 273-285.