



LAPORAN PENELITIAN DOSEN MUDA
TAHUN ANGGARAN 2004

**AKTIVITAS ANTI-RADIKAL BEBAS DPPH FRAKSI
DIKLORMETAN DAN FRAKSI METANOL FAGRAEA BLUMEI,
FAGRAEA RACEMOSA DAN FAGRAEA FRAGRANS**

Peneliti:

Dra. A. Fuad Hafid, MS.,Apt.

LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Dibiayai oleh Proyek Peningkatan Penelitian Pendidikan Tinggi

DIP Nomor : 004/XXIII/1/-/2004 Tanggal 3 Januari 2004

Kontrak Nomor : 108/P2IPT/DPPM/DM, SKW/III/2004

Ditjen Dikti, Depdiknas

Nomor Urut : 15.

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Nopember, 2004



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
UNIVERSITAS AIRLANGGA
LEMBAGA PENELITIAN

- | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|---|
| 1. Pusat Pembangunan Regional | 5. Pusat Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Pusat Kependudukan dan Pembangunan (5995718) |
| 2. Pusat Obat Tradisional | 6. Pusat Studi Wanita (5995722) | 10. Pusat Kesehatan Reproduksi |
| 3. Pusat Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Pusat Olah Raga | |
| 4. Pusat Lingkungan Hidup (5995718) | 8. Pusat Bioenergi | |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

**IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR
HASIL PENELITIAN DOSEN MUDA**

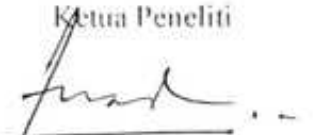
- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. a. Judul Penelitian | PENELITIAN EKSTRAK METANOL <i>FAGRAEA BLUMEI</i> , <i>FAGRAEA FRAGRANS</i> DAN <i>FAGRAEA RACEMOSA</i> DALAM KAITAN AKTIVITAS SEBAGAI ANTIRADIKAL BEBAS |
| b. Macam Penelitian | Eksperimental Laboratorium |
| 2. Kepala Proyek Penelitian | |
| a. Nama Lengkap dan Gelar | Drs. Achmad Fuad Hafid, Apt., MS |
| b. Jenis Kelamin | Laki-laki |
| c. Pangkat/Golongan / NIP | III-d/130 937 972 |
| d. Jabatan sekarang | Lektor |
| e. Fakultas/Puslit/Jurusan | Fakultas Farmasi |
| f. Univ/Inst/Akademi | Universitas Airlangga |
| g. Bidang Ilmu yang ditekuni | Behan Alam |
| 3. Jumlah Tim Peneliti | 1 orang |
| 4. Lokasi Penelitian | Fakultas Farmasi Unair |
| 5. Kerjasama dengan Instansi lain | |
| a. Nama Instansi | - |
| b. Alamat | - |
| 6. Jangka waktu penelitian | 6 bulan |
| 7. Biaya yang diperlukan | Rp. 6.000.000
(Enam juta rupiah) |

Surabaya, Oktober 2004



Prof. Dr. Nani Cholies Z, Apt
NIP. 130 352 372

Ketua Peneliti


Drs. Achmad Fuad Hafid, Apt, MS
NIP. 130 937 972

Menyetujui
Ketua Lembaga Penelitian Unair.


Prof. Dr. H. Sarmanu, MS
NIP. 130 701 125

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga segala rangkaian penelitian ini sampai pada penyelesaian laporan akhir.

Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. DP3M Ditjen Dikti Depdiknas, yang mempercayakan pelaksanaan penelitian ini kepada kami sekaligus mendanai.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk dilakukannya penelitian ini.
3. Kepala Laboratorium Dasar Bersama Universitas Airlangga yang sangat berperan pada fasilitas instrumen dan konsultasi peneliti.
4. Kepala Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Unair yang sangat membantu pelaksanaan penelitian ini.
5. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu yang sangat berperan dalam keberhasilan penelitian ini.

Judul Laporan penelitian ini berbeda dengan Judul proposal yaitu dengan tidak adanya ekstrak diklorometan, disebabkan oleh karena biaya penelitian yang disetujui hanya 60 % dari anggaran biaya yang diajukan. Dengan berkurangnya biaya tersebut menyebabkan penelitian ini hanya dapat dilakukan pada ekstrak metanol saja.

Rasa terima kasih ini menyertai doa kami kepada Allah SWT. Semoga budi baik dan jerih payah selama ini memperoleh manfaat yang sebanyak-banyaknya baik bagi diri sendiri maupun bagi keluarga dan Universitas Airlangga serta masyarakat pada umumnya.

Surabaya, Oktober 2004

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Kata Pengantar	ii
Daftar Isi	iii
Daftar Tabel	v
Daftar Gambar	vi
Ringkasan	vii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang Masalah	1
1.2. Rumusan Masalah	2
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1. Tinjauan tentang Tanaman <i>Fagraea spp.</i>	
2.1.1. Klasifikasi Tanaman	3
2.1.2. Morfologi dan Penyebarannya	3
2.1.3. Kegunaan	4
2.1.4. Kandungan Kimia	4
2.2. Tinjauan tentang Radikal Bebas	4
2.3. Tinjauan tentang Antiradikal Bebas	5
2.4. Tinjauan tentang Difenil Pikril Hidrazil (DPPH)	6
 BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
3.1. Tujuan Penelitian	
3.1.1. Tujuan Umum	8
3.1.2. Tujuan Khusus	8
3.2. Manfaat Penelitian	8
3.3. Hipotesis	8
 BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1. Bahan yang digunakan	9
4.1.1. Bahan Uji	9
4.1.2. Bahan Kimia	9
4.2. Alat yang digunakan	9
4.3. Kerangka Operasional Penelitian	10
4.4. Prosedur	
4.4.1. Ekstraksi simplisia	11
4.4.2. Skrining Fitokimia dan KLT-Autografi	11
4.4.3. Pengujian Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH secara Spektrofotometri	11

BAB V HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
5.1. Hasil Ekstraksi Simplisia	12
5.2. Hasil Skrining Fitokimia dan KLT-Autografi	12
5.3. Hasil Pemeriksaan Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH	14
 BAB VI SIMPULAN DAN SARAN	
5.1. Simpulan	20
5.2. Saran	20
 DAFTAR PUSTAKA	21

DAFTAR TABEL

Tabel		halaman
1	Persentase hasil ekstraksi bagian tanaman <i>Fagraea spp.</i>	12
2	Persamaan Regresi dan EC_{50} Ekstrak metanol Bagian tanaman <i>Fagraea spp.</i>	17

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Reaksi penangkapan radikal H• oleh DPPH	6
2. Hasil KLT-Autografi fraksi metanol <i>Fagraea spp.</i> pada plate Silika gel GF ₂₅₄ dengan eluen CHCl ₃ -MeOH-Air (75:25:1) setelah disemprot dengan Godin.	13
3. Hasil KLT-Autografi fraksi metanol <i>Fagraea spp.</i> pada plate Silika gel GF ₂₅₄ dengan eluen CHCl ₃ -MeOH-Air (75:25:1) 5 menit setelah disemprot dengan larutan DPPH 0,004% dalam MeOH.	13
4. Profil Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH fraksi Metanol <i>Fagraea spp.</i> pada 30 menit.	15
5. Profil Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH Fraksi Metanol <i>Fagraea spp.</i> pada 60 menit.	16
6. Histogram EC50 ekstrak metanol <i>Fagraea spp.</i>	18

RINGKASAN

PENELITIAN EKSTRAK METANOL *FAGRAEA BLUMEI*, *FAGRAEA FRAGRANS* DAN *FAGRAEA RACEMOSA* DALAM KAITAN AKTIVITAS SEBAGAI ANTI-RADIKAL BEBAS

(Achmad Fuad Hafid, 2004, 22 halaman)

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengungkap apakah ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans* dan *Fagraea racemosa* mempunyai sifat sebagai antiradikal bebas DPPH. Perlu diketahui pula potensi dari masing-masing ekstrak metanol batang dan akar *Fagraea blumei*, ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* dan ekstrak metanol kulit batang dan akar *Fagraea racemosa* dengan menentukan besarnya nilai EC_{50} -nya.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi integratif terbaru tentang pemanfaatan bagian tanaman *Fagraea spp.* pada umumnya dan khususnya *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans* dan *Fagraea racemosa* sebagai bahan yang mempunyai kemampuan aktivitas sebagai antiradikal bebas sehingga dapat menjadikan bahan pengembangan obat baru dan segala aspeknya.

Ekstrak metanol diperoleh dengan cara ekstraksi berkelanjutan serbuk kering *Fagraea spp.* dengan *n*-heksan, dilanjutkan dengan diklorometana dan akhirnya residu diekstraksi dengan metanol. Pengujian ekstrak secara KLT-Autografi menggunakan pereaksi penyempnot larutan 0,02 % DPPH dalam methanol terhadap setiap 40 μ g ekstrak. Penentuan EC_{50} secara spektrofotometri dengan mengukur absorbansi larutan uji yang ditambah dengan larutan DPPH, pada panjang gelombang 497; 517; 537 nm. Berbagai konsentrasi larutan uji adalah 50;75;100;150;200 ppm kecuali ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* pada konsentrasi 15;30;50;60;75 ppm dan perubahan adsorbansi diamati pada rentang waktu 30 sampai 60 menit.

Hasil penelitian ini adalah bahwa ekstrak metanol batang dan akar *Fagraea blumei*, ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* dan ekstrak metanol kulit batang dan akar *Fagraea racemosa* menunjukkan aktivitas sebagai anti radikal bebas DPPH.

Nilai EC_{50} Ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* mengindikasikan aktivitas antiradikal bebas DPPH yang lebih tinggi daripada Ekstrak metanol lainnya yaitu dengan nilai EC_{50} =48,902 ppm pada 60 menit. Ekstrak metanol akar *Fagraea blumei* mempunyai aktivitas paling rendah yaitu dengan nilai EC_{50} =196,799 ppm pada 60 menit, tidak berbeda jauh dengan ekstrak metanol akar *Fagraea auriculata* dengan nilai EC_{50} =195,374 ppm. Sedangkan Ekstrak metanol batang *Fagraea blumei* pada 60 menit menunjukkan nilai EC_{50} =155,925 ppm, Ekstrak metanol kulit batang *Fagraea racemosa* dengan nilai EC_{50} =131,976 ppm.

SUMMARY

FREE RADICAL SCAVENGER (DPPH) PROPERTIES OF METHANOLIC EXTRACTS OF *FAGRAEA BLUMEI*, *FAGRAEA FRAGRANS* AND *FAGRAEA RACEMOSA*

The research of free radical scavenger properties of methanolic extracts of *Fagraea blumei*'s roots, stems, stem cortex of *Fagraea fragrans* and *Fagraea racemosa*'s stem cortex, roots was conducted as a further investigation of *Fagraea spp.* which was reported that methanolic extract of *Fagraea auriculata* and *Fagraea ceilanica* showed the free radical scavenging activities.

The methanol extract obtained from successive extraction of samples with n-hexane, dichloromethane and then methanol as solvents. DPPH scavenging activity of methanolic extracts of *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans* and *Fagraea racemosa* was determined by TLC-DPPH method. (0,02 % DPPH in Methanol as spray reagent)

Cuvette assay of DPPH radical scavenging activity 50 (EC_{50}), each sample 0,30 ml) was added to 2,70 ml DPPH solution (4,00 mg DPPH in 100 ml methanol) in a disposable cuvette. The absorbance at 497, 517, 537 nm was then monitored at 30, 60 seconds. The extracts concentration were 50;75;100; 150;200 ppm except extract of stem cortex of *Fagraea fragrans* was 15;30;50;60;75 ppm.

All methanolic extracts showed free radical scavenging activities (DPPH) by TLC-autographic assay. The lowest EC_{50} (=44,902 ppm) was in methanolic extract of stem cortex of *Fagraea fragrans* its mean that the highest free radical activity was in that extract, while the highest EC_{50} (= 196,799 ppm) was in methanolic extract of roots of *Fagraea blumei*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang masalah

Fagraea spp merupakan jenis tumbuhan yang banyak tumbuh di hutan , baik sebagai tanaman hutan primer maupun sekunder terutama di Kalimantan, Sumatra dan Jawa. Tumbuhan ini masih belum banyak dikenal luas oleh masyarakat. Kayunya sering digunakan sebagai papan, perkakas rumah tangga dan tiang rumah. Secara tradisional daunnya digunakan sebagai alas tidur bayi prematur, penyakit beri-beri, obat panas, dan obat sakit kepala (Sangat, dkk., 2000; Saw, et.al. 1962).

Penelitian tentang *Fagraea spp* telah dilakukan antara lain menunjukkan ekstrak metanol akar *Fagraea racemosa* menunjukkan efek vasodilator dan analgesik. Hal ini disebabkan karena ekstrak tersebut mengandung pinoresinol yang merupakan senyawa lignan (Okuyama, et.al., 1995). Senyawa tersebut juga terdapat pada ekstrak metanol buah zaitun yang telah terbukti sebagai antiradikal bebas (Robert, et.al., 2000).

Hasil penelitian ekstrak metanol batang *Fagraea blumei* yang mengandung glikosida iridoid dan flavonoid memiliki aktivitas antiradikal bebas dan senyawa tersebut juga terdapat pada daunnya (Cuendet, et.al., 1997).

Penelitian yang lalu terhadap fraksi metanol *Fagraea auriculata* dan *Fagraea ceilanica* telah menunjukkan adanya aktivitas antiradikal bebas DPPH pada keduanya dengan kekuatan yang berbeda (Fuad, 2003). Dalam uji laboratoris awal (observasi) yang dilakukan peneliti ternyata diperoleh hasil bahwa fraksi diklormetan kedua tanaman tersebut juga menunjukkan aktivitas antiradikal bebas DPPH.

Penyebaran flavonoid mempunyai kecenderungan kuat bahwa tanaman yang secara taksonomi berkaitan misalnya dari marga atau suku yang sama akan menghasilkan senyawa yang jenisnya serupa (Markham, 1988). Sehingga memungkinkan fraksi diklormetan dan fraksi metanol

Fagraea blumei, *Fagraea racemosa*, *Fagraea fragrans* bersifat penangkap radikal bebas DPPH.

Radikal bebas merupakan senyawa yang mengandung elektron yang tidak berpasangan yang dapat bertindak sebagai akseptor elektron (Bast, et.al., 1991). Radikal bebas sangat reaktif sehingga dapat merusak sel yang disebabkan oleh peroksidasi lipid yang menyebabkan kerugian seperti iskemia, arterosklerosis koroner, diabetes melitus, dan penuaan kulit (Hiriguchi, et.al., 1995). Peroksidasi lipid adalah reaksi berantai yang terus menerus menyediakan radikal bebas yang menentukan peroksidasi selanjutnya (Robert, 1990).

Antiradikal bebas adalah senyawa yang dalam jumlah kecil dibanding substrat mampu menunda atau menjaga terjadinya oksidasi dari substrat yang mudah teroksidasi (Haliwell, 1991).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, bunga, buah dan biji (Harborne, 1987). Beberapa tahun belakangan diteliti kemampuan flavonoid sebagai antioksidan dimana flavonoid mempunyai kemampuan untuk merubah atau mereduksi radikal bebas dan juga sebagai antiradikal bebas (Giorgio, 2000).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi integratif terbaru tentang pemanfaatan bagian tanaman *Fagraea spp.* sebagai bahan yang mempunyai kemampuan aktivitas sebagai antiradikal bebas, sehingga dapat menjadikan bahan pengembangan obat baru dan segala aspeknya

1.2. RUMUSAN MASALAH

Permasalahan penelitian dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Adakah aktivitas anti radikal bebas DPPH ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea racemosa* dan *Fagraea fragrans* ?
2. Berapakah besarnya nilai EC_{50} ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea racemosa* dan *Fagraea fragrans* ?

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan tentang Tanaman *Fagraea* spp.

2.1.1. Klasifikasi tanaman (Backer, and Bakhuizen, 1965)

Divisi : Spermatophyta
Anak divisi : Angiospermae
Klas : Dicotyledonae
Bangsa : Apocynales
Suku : *Loganiaceae*
Marga : *Fagraea*

2.1.2. Morfologi dan Penyebarannya (Saw, et.al., 1962)

Fagraea blumei berupa pohon dan kadang epipitic, percabangan lebar, perbungaan agak besar dengan bunga banyak, kelopak berbentuk lonceng, mahkota bunga seperti kapal, buah besar dengan satu benjolan keras, daun obovatus (bulat telur terbalik) dengan tulang daun yang besar.

Tanaman ini banyak tumbuh di lahan basah yang terkena sinar matahari terutama di hutan primer dan sekunder pada aliran sungai, dengan ketinggian 1200 - 1800 m di daerah Jawa, Sumatera dan Kalimantan.

Tanaman ini tumbuh pada tempat yang terkena sinar matahari di daerah berawa hingga lahan kering dengan ketinggian 0-2000 m.

Fagraea racemosa merupakan tumbuhan perdu atau pohon dengan tinggi antara 2-10 m bahkan sampai 16 m.

Tanaman ini banyak terdapat di Birma, Indocina, Malaysia, Sumatera, Jawa, Bali, Kalimantan dan Halmahera. Biasanya tumbuh di hutan primer dan sekunder pada ketinggian 0-2000 m, padang alang-alang.

Fagraea fragrans merupakan pohon walaupun kadang-kadang perdu dengan tinggi 8-25 m bahkan 55 m dan diameternya sampai 2,5 m.

Tanaman ini banyak terdapat di Birma, Indocina, Malaysia, Filipina, Sulawesi, Jawa, Kalimantan dan Guinea Baru. Biasanya tumbuh di hutan

primer dan sekunder pada ketinggian 0-800 m, sepanjang pantai (di Malaysia).

2.1.3. Kegunaan (Saw, et.al., 1962)

Oleh masyarakat di daerah Sumatra, Jawa, Kalimantan, Malay Peninsula dan Filipina daun *Fagraea blumei* digunakan secara tradisional sebagai obat panas dan sakit kepala sedangkan getah buah sebagai lem untuk menangkap burung.

Kayu *Fagraea racemosa* digunakan untuk papan. Dekokta dari daun, akar, batang *Fagraea racemosa* dapat digunakan untuk tonik di daerah Malaya, sedangkan di Filipina kayu dan bunga digunakan sebagai antidotum gigitan ular.

Kayu *Fagraea fragrans* amat dikenal sebagai bahan untuk konstruksi rumah dan jembatan dan bahkan untuk perahu bagi nelayan. Dekokta dari kulit kayunya digunakan sebagai obat panas dalam kasus malaria dan pada perdaraha faeces dalam kasus disentri (Kedah-Malaysia).

2.1.4. Kandungan Kimia

Penelitian menyebutkan bahwa terkandung senyawa iridoid glikosida (blumeosida A, blumeosida B, blumeosida C dan blumeosida D) dan flavonoid C-glikosida dalam ekstrak metanol kulit batang *Fagraea blumei*. (Cuendet, et.al., 1999)

Isolasi terhadap akar *Fagraea racemosa* Jack ex Wall. dan berhasil mengisolasi senyawa lignan (+)-pinoresinol, (+)-epipinoresinol, (+)-lariciresinol dan (+)-isolariciresinol) dan senyawa fenol (syringaldehyde dan 7,8 dihydro-7-oxy coniferyl alcohol) (Okuyama, et.al., 1995).

2.2. Tinjauan tentang Radikal Bebas

Radikal bebas didefinisikan sebagai spesies yang keberadaannya bebas dan mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan, karena elektronnya sendirian radikal bebas menjadi lebih reaktif dari non radikal dan cenderung untuk mencari elektron guna membentuk pasangannya.

Pembentukan radikal bebas yang terdiri tiga tahap, yaitu: (Halliwell, 1991)

a. Tahap inisiasi/tahap pembentukan rantai.



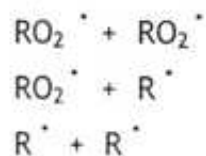
Pada tahap ini senyawa organik normal, yaitu inisiator berubah menjadi partikel radikal bebas aktif. Selain itu senyawa lain yang lebih labil misalnya peroksida, mudah pecah menjadi radikal bebas.

b. Tahap propagasi/ perpanjangan rantai.



Tahap ini merupakan tahap reaksi rantai yang sebenarnya. Pada tahap ini radikal bebas R dapat bereaksi dengan satu molekul oksigen membentuk radikal baru $RO_2^{\cdot}$, yang dinamakan radikal peroksida.

c. Tahap terminasi / pengakhiran rantai.



Pada reaksi terakhir ini terjadi bila dua radikal bebas bertemu sehingga keduanya bergabung dan membentuk ikatan kovalen dengan dua elektron milik bersama dan menyebabkan molekul tersebut tidak reaktif lagi.

2.3. Tinjauan tentang Antiradikal Bebas

Antiradikal bebas adalah bahan yang dalam kadar rendah dapat mencegah terjadinya oksidasi dari substrat yang mudah teroksidasi. Secara normal didalam tubuh terdapat antiradikal bebas seperti GPx (glutation peroksidase), SOD (superoksid dismutase), tetapi bila keseimbangan sistem dalam tubuh terganggu maka perlu penambahan antiradikal bebas dari luar guna menanggulangi timbulnya keadaan patologis. (Halliwell, 1991)

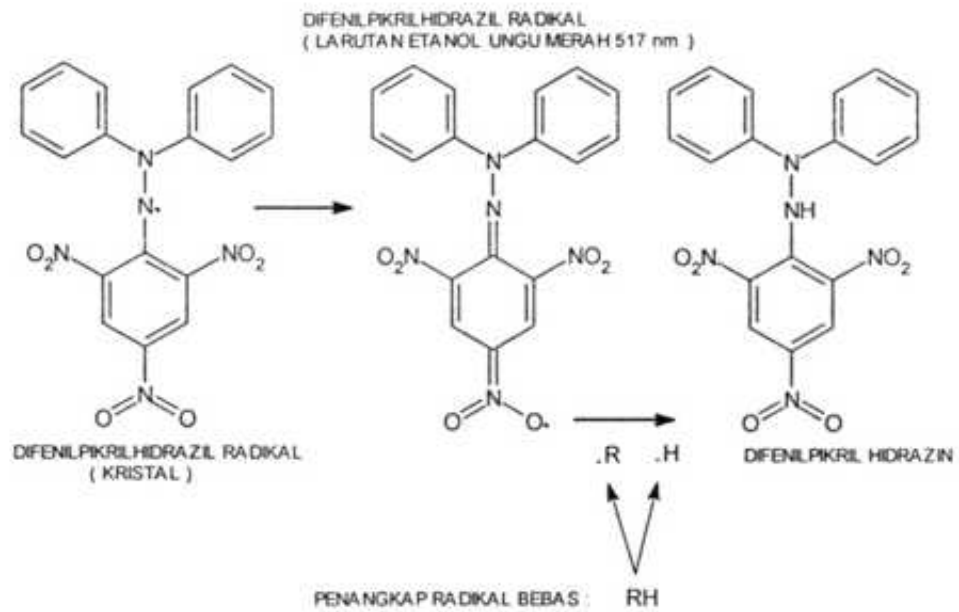
Menurut cara kerjanya antiradikal bebas dibagi menjadi tiga, yaitu: (1) Antioksidan, bekerja dengan cara bereaksi dengan radikal bebas, sehingga periode induksi reaksi oksidasi diperpanjang. Contohnya : vitamin E, tanpa adanya oksigen vitamin E stabil terhadap panas dan alkali, tetapi dengan adanya oksigen, vitamin E akan teroksidasi secara perlahan dan dipercepat dengan adanya garam besi dan perak, yang lambat laun akan terurai jika terkena cahaya. (2) Bahan pereduksi, bahan yang mempunyai potensial oksidasi lebih rendah dari potensial bahan yang dilindungi sehingga dapat mencegah terjadinya oksidasi. Contohnya vitamin C, stabil pada udara kering tetapi cepat teroksidasi jika dalam bentuk larutan dengan adanya udara. (3) Antiradikal bebas sinergis, bahan yang dapat mempunyai efek antiradikal bebas yang kecil, tetapi dapat menambah kemampuan antiradikal bebas yang lain dengan jalan bereaksi dengan ion logam berat yang berfungsi sebagai katalisator reaksi oksida.

2.4. Tinjauan tentang Diphenil Pikril Hidrazil (DPPH)

DPPH ($C_{18}H_{12}N_5O_6$) serbuk berwarna hijau BM = 394,33 sebagai radikal bebas yang larut dalam metanol , alkohol. Bila senyawa tersebut dilarutkan dalam metanol atau alkohol akan berwarna ungu dan apabila bereaksi dengan antiradikal maka warna larutan akan memucat. Perubahan ini diamati pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer.

Reaksi yang terjadi berjalan dengan kecepatan tertentu sesuai persamaan berikut:

Gambar 1. Reaksi penangkapan radikal $H\bullet$ oleh DPPH.



BAB III

TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1. Tujuan Penelitian

3.1.1. Tujuan umum

Penelitian Pemanfaatan *Fagraea spp.* sebagai bahan yang mempunyai aktivitas sebagai Anti-Radikal Bebas DPPH (*free radical scavenger*).

3.1.2. Tujuan khusus

1. Mengetahui aktivitas anti-radikal bebas DPPH ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans*, *Fagraea racemosa*.
2. Menentukan besarnya nilai EC_{50} ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea racemosa*, *Fagraea fragrans*.

3.2. Manfaat Penelitian

Memberikan data ilmiah bahwa tanaman *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans* dan *Fagraea racemosa* mempunyai aktivitas anti-radikal bebas DPPH.

3.3. Hipotesis

Ekstrak metanol *Fagraea blumei*, *Fagraea fragrans* dan *Fagraea racemosa* mempunyai aktifitas anti-radikal bebas DPPH.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan yang digunakan

4.1.1. Bahan uji

1. Serbuk simplisia batang dan akar *Fagraea blumei* hutan raya Cagar Malang (Jatim) 1200m dpl diambil pada bulan Februari 2001.
2. Serbuk simplisia kulit batang dan akar *Fagraea racemosa*, diambil pada bulan Mei 2001 dan kulit batang *Fagraea fragrans*. diambil pada bulan April 2002 dari kawasan hutan Samarinda (Kaltim) 300m dpl.

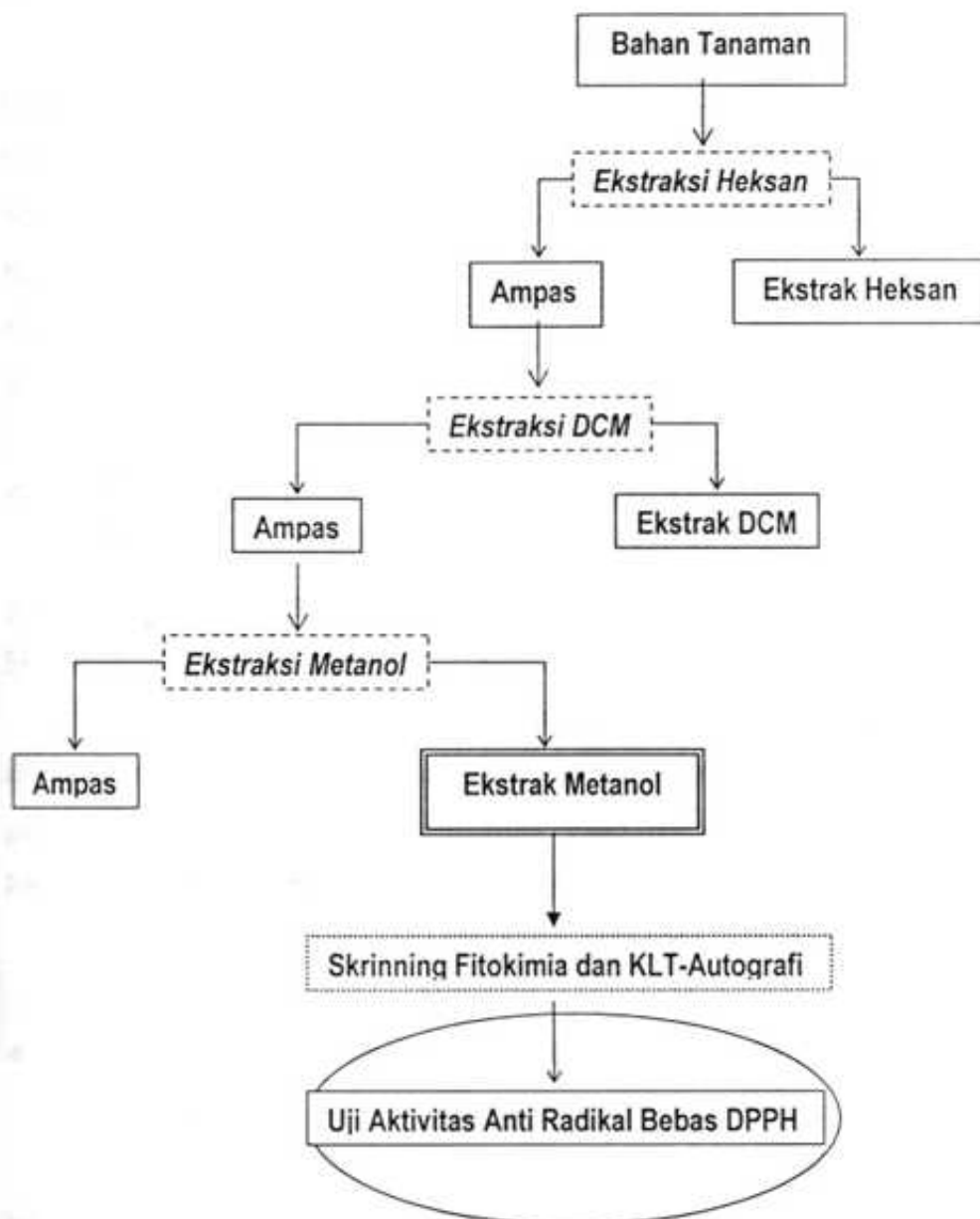
4.1.2. Bahan Kimia

- Godin A dan B
- DPPH SIGMA™
- Diklorometana p.a.
- *n*-Heksana p.a.
- Metanol p.a.
- Metanol redistilasi
- Silika gel GF₂₅₄

4.2. Alat yang digunakan

- Alat-alat gelas
- Vacuum Rotavapour R-114
- Brand Transverpette
- Chamber
- Mikrokapiler
- Perkulator
- Shimadzu double monochromator recording Spectrofotometer UV-Vis 365
- Timbangan analitik

4.3. Kerangka Operasional Penelitian



4.4. Prosedur

4.4.1. Ekstraksi Simplisia *Fagraea spp.*

Serbuk simplisia ditimbang 125 g, dilakukan 3 kali maserasi masing-masing selama 24 jam dengan pelarut *n*-heksan, ampas dianginkan-anginkan sampai kering. Setelah kering dilakukan 3 kali maserasi masing-masing selama 24 jam dengan pelarut diklorometana. Setelah dikeringkan ulangi maserasi dengan Metanol. Filtrat disaring dan masing-masing fraksi untuk dirotavapour. Dalam penelitian ini hanya fraksi metanol yang digunakan sebagai bahan uji.

4.4.2. Skrinning Fitokimia dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)- Autografi.

Larutan uji dengan konsentrasi 10.000 ppm ditotolkan sebanyak 4 µl pada plate silika gel GF₂₅₄. Plate dielusi menggunakan eluen yang sesuai. Setelah eluasi selesai, plate diangkat dan keringkan.

Amati penampakan spot di bawah UV, plate disemprot dengan larutan DPPH 0,004% dalam metanol. Masing-masing ekstrak ditotolkan sebanyak 40 µg. Aktivitas teramati sebagai spot yang berwarna putih pucat sampai kekuningan dengan latar belakang ungu.

Setelah warna ungu hilang, plate disemprot dengan pereaksi Godin.

4.4.3. Pengujian Aktivitas Antiradikal Bebas DPPH secara Spektrofotometri

Tambahkan 300 µl larutan sampel dengan larutan DPPH ad 3,0 ml kemudian dilihat absorban pada 3 panjang gelombang. Hitung persen peredaman absorbansi untuk 5 konsentrasi. Absorbansi diamati pada panjang gelombang 497; 517 dan 537 nm pada masing-masing ekstrak dan diamati pada rentang waktu 5 sampai 60 menit. Konsentrasi yang digunakan adalah 50-200 ppm. Aktivitas terukur sebagai EC₅₀ (*effective concentration*) yang diperlukan untuk meredam absorbansi hingga 50%.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

5.1. Hasil Ekstraksi Simplisia *Fagraea spp.*

Bahan uji adalah fraksi metanol bagian tanaman *Fagraea blumei*, *Fagraea racemosa* dan *Fagraea fragrans* yang diperoleh dengan ekstraksi berkelanjutan dengan metode maserasi menggunakan pelarut berturut-turut *n*-heksan, diklorometana, dan metanol. Dengan metode ini, diharapkan akan diperoleh senyawa-senyawa polar yang hanya tersari dengan metanol, sehingga hasil uji menggambarkan aktivitas yang diberikan oleh senyawa-senyawa polar tersebut. Persentase hasil ekstraksi masing-masing dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Persentase Hasil Ekstraksi Bagian Tanaman *Fagraea spp.*

Simplisia	Persentase Hasil % (b/b)		
	ekstrak <i>n</i> -Heksan	ekstrak Diklorometana	ekstrak Metanol
Akar <i>Fagraea blumei</i>	1,8	2,4	5,4
Batang <i>Fagraea blumei</i>	0,5	0,4	0,6
Akar <i>Fagraea racemosa</i>	1,07	0,27	0,6
Kulit Batang <i>Fagraea racemosa</i>	3,7	1,7	3,7
Kulit Batang <i>Fagraea fragrans</i>	0,4	1,2	13

5.2. Hasil Skrining Fitokimia dan Krotamografi Lapis Tipis (KLT)- Autografi

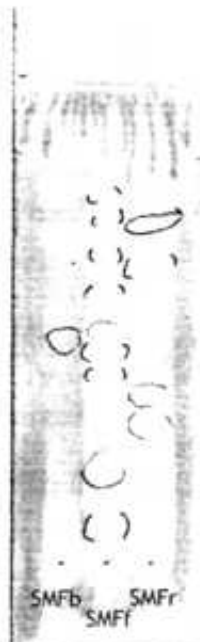
Pada penelitian ini skrining Fitokimia dan KLT-Autografi dimaksudkan untuk mengetahui profil KLT masing-masing fraksi metanol dan apakah komponen-komponen fraksi tersebut, mempunyai aktivitas antiradikal bebas DPPH, dengan menyemprotkan larutan DPPH 0,02 % pada plate KLT hasil eluasi dengan eluen yang sesuai. Aktivitas antiradikal DPPH ditandai dengan adanya pemucatan (*bleching*) pada spot-spot tertentu dengan latar belakang ungu.

Dibuat larutan fraksi dalam metanol dengan konsentrasi kurang lebih sama (10.000 ppm), kemudian masing-masing larutan ditotolkan 4,0 μ l. Jumlah penotolan dibuat sekecil mungkin ($\pm$ 40 μ g) supaya terjadi pemisahan antar komponen fraksi yang sempurna sehingga spot peredaman warna DPPH yang dihasilkan murni aktivitas komponen tersebut.



Keterangan :
 SMFb = Fraksi metanol Batang *Fagraea blumei*
 SMFf = Fraksi metanol Kulit Batang *Fagraea fragrans*
 SMFr = Fraksi metanol Kulit Batang *Fagraea racemosa*

Gambar 2. Hasil KLT-Autografi ekstrak metanol *Fagraea spp.* pada plate Silika gel GF₂₅₄ dengan eluen CHCl₃-MeOH-Air (75:25:1) setelah disemprot dengan Godin.



Keterangan :
 SMFb = Fraksi metanol Batang *Fagraea blumei*
 SMFf = Fraksi metanol Kulit Batang *Fagraea fragrans*
 SMFr = Fraksi metanol Kulit Batang *Fagraea racemosa*

Gambar 3. Hasil KLT-Autografi fraksi metanol *Fagraea spp.* pada plate Silika gel GF₂₅₄ dengan eluen CHCl₃-MeOH-Air (75:25:1) 5 menit setelah disemprot dengan larutan DPPH 0,02% dalam MeOH.

Seperti yang ditunjukkan gambar 2. profil KLT antar fraksi metanol *Fagraea spp.* tampak berbeda, baik dengan pemayaran UV maupun dengan penyemprotan Godin. Sebagian besar komponen fraksi metanol batang *Fagraea blumei* hanya terdeteksi dengan Godin, sedangkan dengan UV₂₅₄ (spot dalam lingkaran) hanya komponen pada $R_f=0,5$. Fraksi metanol kulit batang *Fagraea fragrans* mengandung komponen dengan spot-spot berfluorosensi biru pada UV₃₆₅ (spot dalam tanda kurung), spot dengan $R_f=0,5$ dan $0,1$ tampak dominan dengan Godin. Fraksi metanol kulit batang *Fagraea racemosa* mengandung komponen-komponen yang terdeteksi baik dengan Godin maupun pemayaran UV₂₅₄ (spot dalam lingkaran), dengan spot dominan pada $R_f<0,5$ dan $R_f=0,8$ dengan UV₃₆₅.

Pada gambar 3. menunjukkan bahwa komponen fraksi metanol kulit batang *Fagraea fragrans* dengan segera dapat memberikan peredaman terhadap warna DPPH, pemucatan dominan pada spot dengan $R_f<0,5$. Sedangkan komponen fraksi metanol batang *Fagraea auriculata*, hanya spot dengan harga $R_f<0,3$ dan $R_f=0,7$ saja yang memberikan peredaman, demikian juga dengan fraksi metanol kulit batang *Fagraea racemosa*, spot dengan $R_f=0,6$.

Pada pemeriksaan selanjutnya akan diketahui lebih jelas perbedaan aktivitas dan peningkatan aktivitas dari komponen-komponen yang terkandung dalam fraksi metanol *Fagraea spp.*

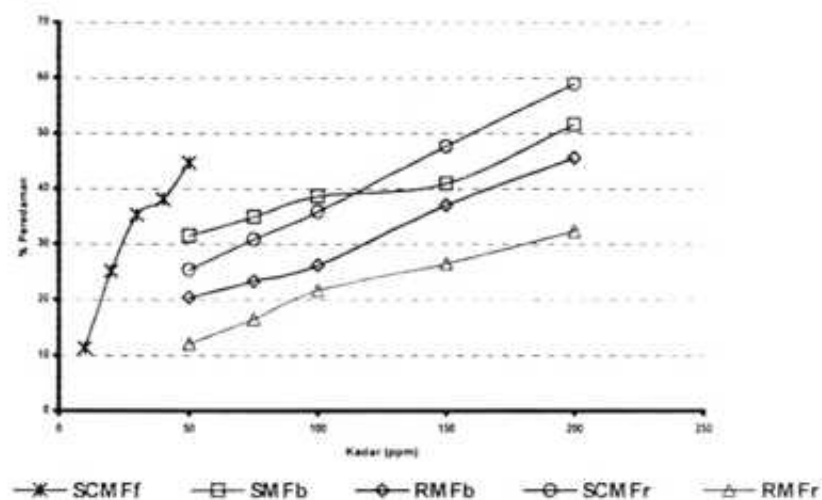
5.3. Hasil Pemeriksaan Aktivitas Anti-Radikal Bebas DPPH secara

Spektrofotometri

Pemeriksaan aktivitas anti radikal bebas DPPH secara spektrofotometri dilakukan dengan mereaksikan fraksi dengan larutan DPPH 0,004 %. Aktivitas diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH. Peredaman tersebut dihasilkan oleh bereaksinya molekul Difenil Pikril Hidrazil (DPPH) dengan atom Hidrogen yang dilepaskan satu molekul komponen bahan uji sehingga terbentuk senyawa Difenil Pikril Hidrazin yang berwarna kuning.

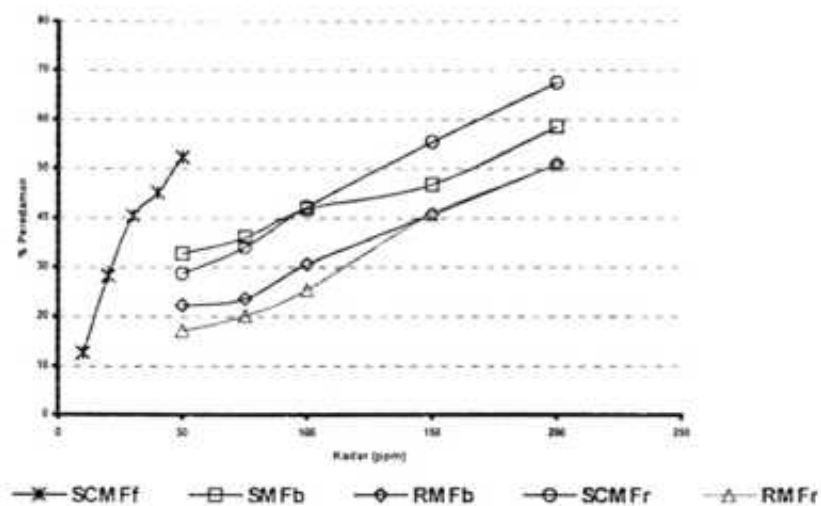
Pemeriksaan dilakukan secara spektrofotometri dengan mengukur absorbansi DPPH pada panjang gelombang 517 ± 20 nm. Persen peredaman dihitung dengan pengurangan absorbansi hitung DPPH blanko dengan absorbansi hitung bahan uji.

Pemeriksaan diawali dengan percobaan mencari konsentrasi aktif. Pada konsentrasi 500 ppm, ternyata fraksi dengan segera memberikan peredaman sehingga konsentrasi percobaan diturunkan sampai 200 ppm. Rentang konsentrasi percobaan harus menggambarkan konsentrasi efektif, artinya pada rentang konsentrasi tersebut memberikan korelasi yang linear dengan aktivitas sampai 50 % atau berkisar antara 30 - 70 % sehingga EC_{50} (Konsentrasi Efektif 50) dapat ditentukan dengan interpolasi aktivitas 50% pada persamaan kurva.



Keterangan :
 SCMf : Fraksi metanol kulit batang *F. fragrans*
 SMFb : Fraksi metanol batang *F. blumei*
 RMFb : Fraksi metanol akar *F. blumei*
 SCMFr : Fraksi metanol kulit batang *F. racemosa*
 RMFr : Fraksi metanol akar *F. racemosa*

Gambar 4. Profil Aktivitas Anti-Radikal Bebas DPPH dari Fraksi Metanol *Fagraea spp.* pada 30 menit.



Keterangan :

SCM Ff : Fraksi metanol kulit batang *F. fragrans*

SM Fb : Fraksi metanol batang *F. blumei*

RM Fb : Fraksi metanol akar *F. blumei*

SCM Fr : Fraksi metanol kulit batang *F. racemosa*

RM Fr : Fraksi metanol akar *F. racemosa*

Gambar 5. Profil Aktivitas Anti-Radikal Bebas DPPH dari Fraksi Metanol *Fagraea spp.* pada 60 menit.

Pada gambar 4. ditunjukkan bahwa setelah 30 menit aktivitas anti-radikal bebas yang kuat diberikan oleh ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans*, yang mana sampai dengan konsentrasi percobaan 50 ppm ekstrak ini memberikan peningkatan aktivitas yang besar. Sedangkan ekstrak metanol batang dan akar *Fagraea blumei* dan ekstrak metanol kulit batang dan akar *Fagraea racemosa* tidak memberikan peningkatan aktivitas sekuat *Fagraea fragrans*, meskipun konsentrasi percobaan dibuat sampai 200 ppm.

Setelah 60 menit dicapai profil aktivitas sebagaimana dapat dilihat pada gambar 5. masing-masing ekstrak secara relatif tidak menunjukkan adanya perbedaan bila dibandingkan dengan profil aktivitas setelah 30 menit, yang mana ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* memberikan peningkatan aktivitas yang tertinggi jika dibandingkan dengan ekstrak lainnya. Peningkatan aktivitas anti-radikal bebas antara 30 menit dengan 60 menit yang tertinggi hanya ditunjukkan oleh ekstrak metanol akar *Fagraea racemosa*.

Harga konsentrasi efektif (EC_{50}) masing-masing ekstrak seperti tertera pada tabel 2. diperoleh dengan interpolasi aktivitas 50% pada persamaan regresi antara aktivitas vs. konsentrasi.

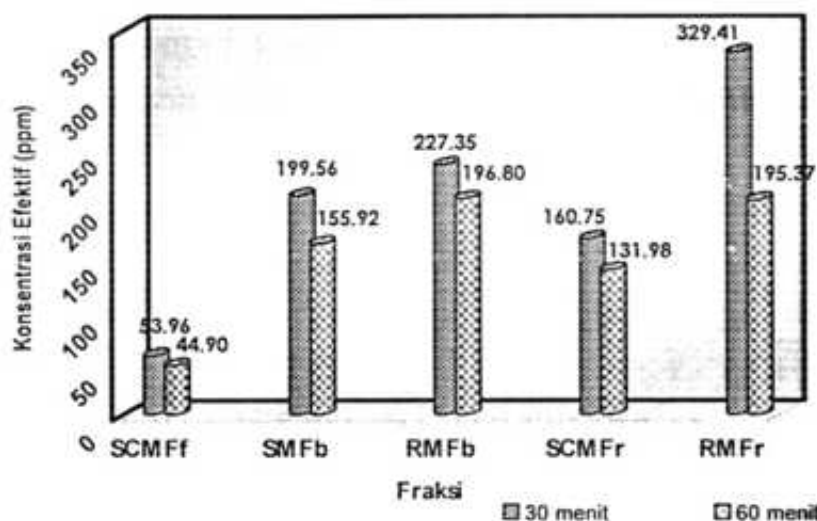
Tabel 2. Persamaan Regresi dan EC_{50} Ekstrak metanol Bagian tanaman *Fagraea spp.*

Ekstrak	30 menit	r	EC_{50}	60 menit	r	EC_{50}
SCMFF	$y = 0.7989x + 6.8939$	0.9684	53.957	$y = 0.9618x + 6.8131$	0.9751	44.902
SMFb	$y = 0.1241x + 25.234$	0.9735	199.565	$y = 0.1671x + 23.945$	0.9900	155.925
RMFb	$y = 0.174x + 10.441$	0.9945	227.351	$y = 0.2009x + 10.463$	0.9942	196.799
SCMFr	$y = 0.2248x + 13.864$	0.9997	160.747	$y = 0.2627x + 15.33$	0.9990	131.976
RMFr	$y = 0.1315x + 6.6829$	0.9902	329.408	$y = 0.2379x + 3.5205$	0.9936	195.374

Dari harga EC_{50} dapat diinterpretasikan bahwa ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* mempunyai aktivitas antiradikal bebas DPPH yang paling tinggi daripada ekstrak metanol *Fagraea blumei* dan *Fagraea racemosa*, dengan harga EC_{50} =44,902 ppm pada 60 menit. Ekstrak metanol akar *Fagraea blumei* mempunyai aktivitas paling rendah dengan harga EC_{50} =196,799 ppm pada 60 menit. Sedangkan ekstrak metanol batang *Fagraea blumei* pada 60 menit mempunyai harga EC_{50} =155,925 ppm, ekstrak metanol akar *Fagraea racemosa* dengan harga EC_{50} =195,374 ppm, dan ekstrak metanol kulit batang

Fagraea racemosa dengan harga $EC_{50}=131,976$ ppm. Perbedaan akan lebih jelas terlihat pada gambar 6.

Gambar 6. Histogram EC_{50} ekstrak metanol *Fagraea spp.* pada 60 menit



Keterangan :

SCMff : Ekstrak metanol kulit batang *F. fragrans*

SMFb : Ekstrak metanol batang *F. blumei*

RMFb : Ekstrak metanol akar *F. blumei*

SCMFr : Ekstrak metanol kulit batang *F. racemosa*

RMFr : Ekstrak metanol akar *F. racemosa*

Perbedaan aktivitas antara ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* dengan ekstrak metanol *Fagraea* lainnya, dapat terjadi karena komponen-komponen ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* lebih banyak yang aktif terhadap DPPH, selaras dengan hasil KLT-Autografi.

Dengan demikian diperoleh beberapa hal sebagai berikut :

- Ada kemungkinan bahwa dalam komponen ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* lebih banyak yang potensial sebagai antiradikal bebas DPPH, sehingga memungkinkan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut, meliputi isolasi senyawa aktif dan uji aktivitas senyawa-senyawa tersebut.
- Ada kemungkinan terjadi interaksi antar komponen yang mempengaruhi aktivitas, baik itu meningkatkan aktivitas maupun menurunkan aktivitas antiradikal bebas DPPH, sehingga hasil EC_{50} di sini, belum dapat menggambarkan aktivitas masing-masing senyawa aktif.

Memperhatikan data diatas dan dihubungkan dengan masih banyaknya spesies *Fagraea* yang belum diteliti, maka kemungkinan *Fagraea spp.* yang lain juga mempunyai aktivitas antiradikal bebas-DPPH. Disadari bahwa aktivitas ekstrak yang diteliti berasal dari senyawa yang dikandungnya, maka upaya isolasi kandungan kimia untuk mengetahui komponen aktif akan memberikan informasi yang lebih lengkap bagi penelitian yang telah dilakukan.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan :

1. Ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans*, ekstrak metanol kulit batang dan akar *Fagraea racemosa* dan ekstrak metanol batang dan akar *Fagraea blumei* menunjukkan aktivitas anti radikal bebas DPPH.
2. Nilai EC_{50} Ekstrak metanol kulit batang *Fagraea fragrans* mengindikasikan aktivitas antiradikal bebas DPPH yang lebih tinggi daripada Ekstrak metanol lainnya yaitu dengan nilai $EC_{50}=48,902$ ppm pada 60 menit. Ekstrak metanol akar *Fagraea blumei* mempunyai aktivitas paling rendah yaitu dengan nilai $EC_{50}=196,799$ ppm pada 60 menit, tidak berbeda jauh dengan ekstrak metanol akar *Fagraea racemosa* dengan nilai $EC_{50}=195,374$ ppm. Sedangkan Ekstrak metanol batang *Fagraea blumei* pada 60 menit menunjukkan nilai $EC_{50}=155,925$ ppm, Ekstrak metanol kulit batang *Fagraea racemosa* dengan nilai $EC_{50}=131,976$ ppm.

Saran :

1. Perlu dilakukan pengujian yang sama terhadap *Fagraea spp.* lainnya.
2. Perlu dilakukan isolasi kandungan senyawa aktif pada ekstrak metanol *Fagraea fragrans*, *Fagraea racemosa* dan *Fagraea blumei*.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad Fuad Hafid, 2002, Penelitian ekstrak metanol *Fagraea auriculata* dan *Fagraea ceilanica* dalam kaitan aktivitas antiradikal bebas, Penelitian DIK Suplemen, Lembaga Penelitian Unair.
- Backer, C.A and Bakhuizen Van Der Brink, B. C., 1965, Flora of Java , N.V.P Noor dhoff, Groningen, The Netherlands, Vol II hal 210 .
- Bast, Aalt, 1991, Oksidant and Antioksidan : State of The Art, The American Journal of Medicine, Preceeding of A Symposium Oxicant and Antioksidant : Patophysiologic Determinants and Therapeutic Agents, p. 25,30.
- Cuendet, M. Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W.,1997 , Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*, Helvetica Chimica Acta vol 80 : p. 1144 - 1152
- Giorgio, P., 2000, flavonoid as Antioxidants, Journal National Product, 63: 1035-1042
- Haliwell, B., 1991, Reactive Oxigent Spesies In Living System : Source Biochemistry and role in Human Disease , The American Journal of Medicine, Proceedings of A Symposium Oxidant and Antioxidants, : Patophysiologic Determinants and Therapeutic Agents, pp. 3,12,20.
- Harborne, J.B., 1987, Metode Fitokimia : Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan (terjemahan) , Penerbit ITB, Bandung , hal 58 - 60, 128, 134
- Hiriguchi, H., Saito, T., Okamura, N., Yagi, A., 1995, Inhibition of Lipid Peroxidation and Superoxide Generation By Diterpenoid From *Rasamarinus officinalis*, Planta Medica, 61 : 333-336.
- Markham, K. R., 1988 , Cara Mengidentifikasi Flavonoid (terjemahan), Penerbit ITB , Bandung , hal 13 .
- Okuyama, E., Suzumura K., Yamazaki, M., 1995, Pharmacologically Active Components of Topodon Puok (*Fagraea racemosa*), a Medicinal Plant from Borneo, Chemical Pharmaceutical Bulletin 43 : 2200 - 2204
- Pine, Stanley, 1988, Kimia Organik (terjemahan), jilid IV, Penerbit ITB, Bandung, hal 955.
- Robert, K. M., 1990, Harper's Biochemistry, 20th edition, Pretice Hall International Inc, USA , pp 138,139,228.
- Robert , W., 2000, Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil, Clinical Chemistry , 46:976 - 988 .

- Sangat, H., 2000, Kamus Penyakit dan Tumbuhan Obat Indonesia (Etnofitomedika I), Pustaka Populer Obor, Jakarta hal 143 , 150.
- Saw , L. G., 1962 , Flora Malesiana , Malaysia hal 312, 323, 328.