

UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAUN GULMA SIAM (*Chromoleana odorata* L.) DENGAN METODE 1,1-DIFENIL-2-PIKRILHIDRAZIL

Ajmi Saputra*, Abdul Gani, dan Erlidawati

Prodi Kimia FKIP Universitas Syiah Kuala, Darussalam Banda Aceh 23111

*Corresponding Author: ajmi19sp@gmail.com

Abstrak. Telah dilakukan penelitian uji aktivitas antioksidan daun gulma siam (*Chromoleana odorata* L.) dengan metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder, golongan flavonoid dan aktivitas antioksidan yang terdapat dalam daun gulma siam. Sebanyak 315 g daun gulma siam kering yang sudah dihaluskan, dimaserasi dengan etanol 95% diperoleh 100 g ekstrak kental etanol. Sebanyak 70 g ekstrak kental etanol difraksinasi dengan pelarut metanol dan n-heksana menghasilkan fraksi kental metanol 30,72 g dan n-heksana 14,62 g. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol menunjukkan positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid. Fraksi metanol positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tanin. Fraksi metanol dilakukan isolasi dengan metode kromatografi kolom menggunakan eluen n-heksana : etil asetat : diklorometana (1:1:1) sebagai fase gerak pertama, kemudian ditingkatkan gradien kepolarannya untuk menghasilkan pemisahan secara sempurna. Hasil isolasi diperoleh 8 fraksi (A, B, C, D, E, F, G, H) dan hasil analisis secara KLT menunjukkan fraksi A dan B positif mengandung senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi A diperkirakan golongan isoflavon dan fraksi B diperkirakan golongan isoflavon, flavon, flavonol dan kalkon. Analisis FTIR menunjukkan fraksi A dan B mengandung gugus fungsi N-H, O-H (asam karboksilat), C=O (aldehid dan ester), C=C, C-H, C-X (florida), C-O dan C-N. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, diperoleh *Inhibitor konsentrasi* (IC₅₀) untuk ekstrak etanol 15,5067 ppm, fraksi metanol 9,5671 ppm, fraksi A 82,7808 ppm dan fraksi B 16,2336 ppm, sedangkan untuk pembanding (asam askorbat) 0,8913 ppm. Dengan demikian, dapat disimpulkan aktivitas antioksidan yang paling kuat terdapat pada fraksi metanol.

Kata kunci: daun gulma siam, *Chromoleana odorata* L., flavonoid, DPPH.

Abstract. The antioxidant activity of siam weed leaf (*Chromoleana odorata* L.) has been done with 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazil (DPPH) method. This study is intended to know the the content of secondary metabolite compounds, the group of flavonoid and antioxidant activity that found in siam weed leaf. The 315 g dry siam weed leaf that was refined, macerated with ethanol 96% produced 100 g of ethanol viscous extract. The 70 of ethanol viscous extract was fractionated with methanol and n-hexane solvent produced 30,72 g of methanol viscous fraction and 14,62 g n-hexane. The results of phytochemical screening of ethanol extract showed positive that contained compound of alkaloids, flavonoids, saponins, tannins and steroids. Methanol fraction showed positive that contained compound of alkaloids, flavonoids, saponins and tannins. The isolation in methanol fraction was made by coloumn chomatography method using eluent n-hexene : acetate ethyl : dichloromethane (1:1:1) as first mation phase. Then the polarity gradient was increased to produce complete separation. The result of isolation produced 8 fractions (A, B, C, D, E, F, G, H) and the analysis results with TLC showed fraction of A and B was positive contain flavonoids compound. Flaconoids compound that was contained in fraction A was estimated isoflvone group and fraction B was estimated group os isoflavone, flavone, flavonol and chalcone. Analysis FTIR showed that the fraction of A and B containing function group N-H, O-H (carboxylic acid), C=O (aldehyde and ester), C=C, C-H, C-X (florida), C-O and C-N. The result of antioxidant activity test used DPPH method, obtained inhibitor concentration (IC₅₀) for 15,5067 ppm of ethanol extract, 9,5671 of methanol fraction, 82,7808 ppm of fraction A and 16,2336 ppm of fraction B, while for comparison (ascorbic acid) is 0,8913 ppm. This, it can be concluded that strongert antioxidant activity was found in methanol fraction.

Keywords: siam weed leaf, *Chromoleana odorata* L., DPPH.

PENDAHULUAN

Tumbuhan gulma siam adalah tumbuhan yang mudah ditemukan di mana saja karena sifatnya yang dapat tumbuh di sembarang tempat, seperti di pinggir jalan, pinggir sungai, pinggir gunung, hutan dan daerah tanaman perkebunan. Penamaan gulma siam sekarang adalah *Chromoleana odorata* bersinonim dengan nama sebelumnya *Eupatorium odoratum* famili Asteraceae (Ngozi, dkk., 2009). Di Indonesia, selain dikenal dengan nama gulma siam juga disebutkan dengan nama kurinyuh, laruna, kopasanda, pokok selaput tunggul dan tekelan. Khususnya di Aceh sering disebutkan dengan nama sikhoh-khoh, seurapok dan serunei.

Gulma siam merupakan tumbuhan pengganggu yang sangat merugikan tanaman di sekitarnya, karena kompetitor dalam penyerapan air dan unsur hara. Ia menjadi salah satu penyebab turunnya hasil panen pada tanaman perkebunan, seperti cabai, tebu, kelapa, kelapa sawit dan lain-lain. Namun, di sisi lain tumbuhan gulma siam memiliki berbagai potensi bermanfaat bagi kehidupan manusia, di bidang pertanian dapat digunakan sebagai pupuk organik, biopestisida serta herbisida dan di bidang medis secara tradisional dapat digunakan sebagai obat luka, diabetes, batuk serta menghentikan pendarahan.

Daun gulma siam kaya akan polifenol, tanin, saponin, terpenoid, flavonoid (kalkon, flavon, flavonol dan auron), alkaloid dan glikosida sianogenik (Rofida dan Nurwahdaniati, 2015; Ngozi, dkk., 2009). Senyawa polifenol dan flavonoid merupakan antioksidan alami yang banyak terdapat di tumbuhan. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavonol, isoflavon, kateksin, flavonol dan kalkon (Hermiati, dkk., 2013).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menyumbang satu atau lebih elektron kepada radikal bebas, sehingga radikal bebas dapat distabilkan dan proses oksidasi berkelanjutan dapat dihentikan. Tubuh manusia secara alami mampu memproduksi antioksidan, seperti glutathion peroksidase, superoksida dismutase dan glutathion s-transferase (Ramdani, dkk., 2013). Namun, kemampuan ini terbatas dan semakin berkurang seiring bertambah usia, sedangkan reaksi oksidasi yang mengawali munculnya radikal bebas terjadi setiap saat. Keadaan ini semakin bertambah buruk ketika tubuh mengalami stres oksidatif, yaitu dimana jumlah radikal bebas melebihi kapasitas kemampuan netralisasi antioksidan.

Terbentuknya radikal bebas pada organisme hidup secara endogenus yang berasal dari proses metabolik tubuh, seperti respirasi aerobik, leukosit polimorfonuleus, makrofag dan peroksisom, sedangkan secara eksogenus yang berasal dari lingkungan di luar tubuh organisme, yaitu radikal bebas dapat berasal dari asap rokok, radiasi ionisasi, polusi, larutan organik dan pestisida (Mu'nisa, dkk., 2012). Radikal bebas adalah suatu atom, gugus atau molekul yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada orbital luar. Radikal bebas dapat memicu berbagai penyakit degeneratif seperti diabetes, artritis, hipertensi, jantung dan aterosklerosis (Tapan, 2005 dalam Ramdani dkk., 2013).

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pendidikan Kimia Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan dan Teknik Kimia Universitas Syiah Kuala Darussalam Banda Aceh, pada bulan Februari sampai dengan Juni 2017. Sampel yang digunakan pada penelitian ini

adalah daun gulma siam segar sebanyak 1,3 kg yang didapatkan di Gampong Bugak Krueung Kecamatan Jangka Kabupaten Bireuen Provinsi Aceh.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas kimia, gelas ukur, corong kaca, corong pisah, tabung reaksi, labu ukur, neraca analitik, neraca tiga lengan, rotary evaporator, kertas saring, spatula, *chamber*, pipet mikro, pipet tetes, seperangkat alat kromatografi kolom, spektronic 20D+ dan spektrofotometer FTIR.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun gulma siam, metanol, etanol, n-heksana, etil asetat, diklorometana, HCl, NaOH, Mg, FeCl₃, AlCl₃, pereaksi Liebermant Burchard, pereaksi Mayer, Pereaksi Hager, Pereaksi Dragendorf, pereaksi Wagner, pereaksi Borchard, plat silika gel 60 F₂₅₄, silika gel 60 (0,2-0,5 mm), asam askorbat dan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).

Preparasi Sampel dan Ekstraksi

Tumbuhan gulma siam yang telah dipanen, disortir untuk diambil daunnya saja sebanyak 1,3 kg, diracang kecil-kecil dan dikering-anginkan selama 11 hari dalam keadaan terkontrol dan tanpa terkena sinar matahari langsung. Daun gulma siam yang sudah kering dihancurkan dengan blender, sehingga diperoleh berbentuk bubuk. Selanjutnya, dimaserasi menggunakan pelarut etanol 95% selama 3x24 jam, setiap 1x24 jam pelarut diganti. Filtrat dikumpulkan, dievaporasi pada suhu 50°C dengan kecepatan 45 rpm, sehingga diperoleh ekstrak kental etanol daun gulma siam.

Skrining Fitokimia

Uji Alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 4 mL ekstrak etanol ditambah 4 mL NH₃ 10% dan 4 mL CHCl₃. Digojok, didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Dipipet lapisan atas (lapisan CHCl₃), ditambah 1 mL HCl 2 N, digojok dan didiamkan. Kemudian dibagi 6 bagian dalam plat tetes. Satu bagian sebagai pembanding dan 5 bagian lainnya diuji dengan pereaksi Dragendorf, Lieberman Burchard, Wagner, Hager dan Mayer. Hasil positif alkaloid jika dengan pereaksi Dragendorf akan terbentuk endapan coklat jingga atau merah jingga, dengan pereaksi Borchard dan Wagner terbentuk endapan coklat, dengan pereaksi Hager mengalami perubahan warna larutan dan dengan pereaksi Mayer terbentuk endapan putih kekuningan/keruh.

Uji flavonoid dilakukan dengan cara tiga bagian plat tetes masing-masing dimasukkan 1 mL ekstrak etanol. Bagian 1 ditambahkan larutan NaOH 10% beberapa tetes, terjadinya perubahan warna menunjukkan positif fenol. Bagian 2 ditambahkan sedikit serbuk magnesium dan 1-2 tetes HCl pekat, terbentuknya warna jingga menunjukkan adanya flavonoid golongan flavonol dan flavanon. Bagian 3 ditambahkan dengan HCl pekat beberapa tetes, terbentuknya warna merah menunjukkan adanya flavonoid golongan antosianidin. Uji tanin dilakukan dengan cara sebanyak 1 mL ekstrak etanol ditambahkan 1-2 tetes FeCl₃ 1%. Terbentuk larutan hijau kehitaman positif tanin katekol dan biru kehitaman positif tanin galat.

Uji steroid dan triterpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 1 mL ekstrak etanol ditambahkan 1-2 tetes pereaksi Liebermant Burchard. Terbentuk larutan hijau-biru menunjukkan positif steroid dan merah-ungu menunjukkan positif triterpenoid.

Uji saponin dilakukan dengan cara sebanyak 2 mL ekstrak etanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 2 mL H₂O, dikocok kuat secara vertikal. Terbentuk buih/busa dan bertahan sampai 15 menit menunjukkan positif saponin.

Fraksinasi dengan Pelarut

Sebanyak 10 gram ekstrak kental etanol dilarutkan dalam 100 mL metanol teknis, kemudian dipartisi dengan 100 mL n-heksana teknis. Digojok, didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan, dipisahkan. Lapisan bawah (metanol) dipartisi ulang dengan heksana teknis sampai lapisan n-heksana tidak berwarna lagi. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan rotary evaporator (Sembiring, dkk., 2016; Sariningsih, dkk., 2015; Anastasia, dkk., 2016). Selanjutnya, kedua fraksi dilakukan uji flavonoid dengan tiga jenis uji, yaitu NaOH 10%, Wilstatter dan Bate-Smith. Fraksi yang menunjukkan paling banyak positif dilakukan kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kolom dan diuji aktivitas antioksidan.

Kromatografi Lapis Tipis

Fase diam yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄ dan eluen yang digunakan adalah pelarut n-heksana, etil asetat, diklorometana dan metanol serta campuran dari pelarut-pelarut tersebut. Hasil KLT yang didapatkan diamati pola pemisahan yang terbentuk secara langsung. Jika pola tidak terlihat maka digunakan lampu UV 254 nm dan 365 nm, kemudian dihitung harga R_f. Perbandingan eluen yang memiliki pemisahan noda terbaik akan digunakan pada kromatografi kolom.

Kromatografi Kolom

Sebanyak 5 gram sampel dimasukkan dengan hati-hati ke dalam kolom, kemudian dielus dengan eluen yang memiliki pemisahan terbaik pada KLT. Eluen diatur terus-menerus sampai terjadi pemisahan. Eluat ditampung pada tiap botol penampung fraksi sebanyak 10 mL/fraksi. Fraksi tersebut dilakukan KLT penggabungan serta sekaligus diidentifikasi senyawa flavonoid. Fraksi yang menunjukkan positif flavonoid dilanjutkan ke FTIR dan dilakukan uji aktivitas antioksidan.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Larutan DPPH dibuat 1 mM sebagai larutan induk, kemudian diencerkan sampai 0,05 mM dalam labu 10 mL sebagai larutan kontrol. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-560 nm. Ditentukan panjang gelombang maksimum, digunakan untuk pengukuran absorbansi larutan uji. Sampel yang dilakukan uji aktivitas antioksidan adalah ekstrak etanol dan fraksi positif flavonoid. Larutan uji sampel divariasikan 5, 10, 15 dan 20 ppm. Dibuat dengan cara mengambil larutan induk 100 ppm sebanyak 0,5; 1; 1,5 dan 2 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL. Ke dalam labu ukur masing-masing ditambahkan 0,5 mL larutan DPPH 1 mM, kemudian dicukupkan dengan metanol sampai tanda batas. Campuran tersebut digojok hingga homogen, diinkubasi selama 30 menit. Digunakan asam askorbat sebagai pembanding dengan konsentrasi divariasikan 1, 2, 3 dan 4 ppm, dilakukan dengan perlakuan yang sama (Anastasia, dkk., 2016; Katrin, dkk., 2012; Sembiring, dkk., 2012). Setelah didapatkan absorbansi ditentukan persen inhibisi menggunakan persamaan berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{sampel}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100$$

Selanjutnya, dibuat kurva dan ditentukan persamaan garis linearnya. Kemudian ditentukan harga IC₅₀, dimana Y = 50.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 1,3 kg daun gulma siam segar dikering-anginkan, diperoleh daun gulma siam kering 315 gram. Kemudian ukurannya dihaluskan dengan blender, sehingga menjadi bubuk. Tujuan dihaluskan untuk memperbesar luas permukaan sentuh, supaya interaksi zat cairan saat ekstraksi semakin besar. Dimaserasi dengan pelarut etanol 95% selama 3x24 jam, setiap 1x24 jam pelarut diganti. Filtrat yang didapatkan dievaporasi, sehingga diperoleh ekstrak kental etanol daun gulma siam 100 gram dengan persentase rendemennya 31,746. Ekstrak etanol daun gulma siam dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dalam sampel sebelum melakukan analisis lebih mendalam. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol dapat dilihat pada Tabel 1.

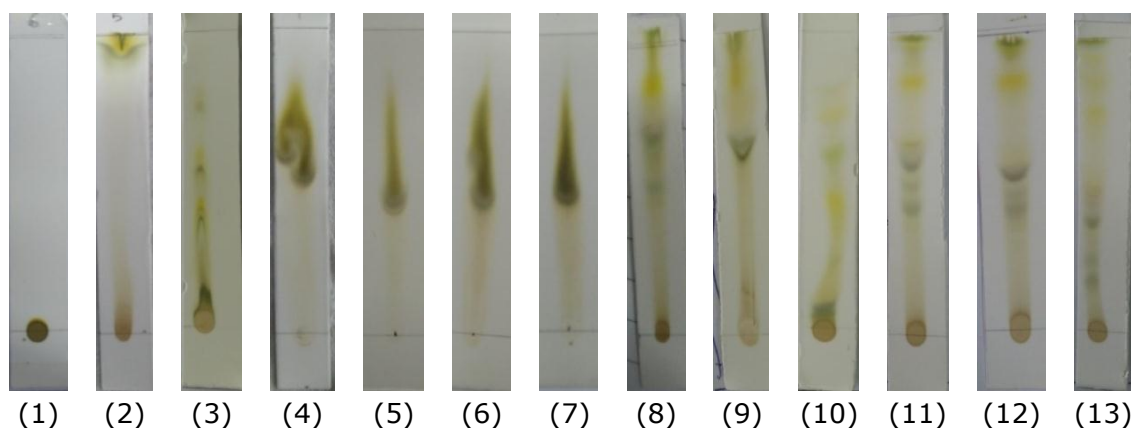
Fraksinasi ekstrak etanol dengan pelarut metanol dan n-heksana bertujuan untuk memisahkan senyawa polar dengan non polar. Sebanyak 70 g ekstrak etanol difraksinasi dengan pelarut metanol dan n-heksana. Hasil fraksinasi yang didapatkan setelah dipekatkan adalah 30,72 gram untuk fraksi metanol dan 14,62 gram untuk fraksi n-heksana. Selanjutnya, kedua fraksi tersebut dilakukan uji flavonoid dengan 3 jenis uji, yaitu uji NaOH, uji Wistatter dan uji Bate-Smith. Fraksi yang menunjukkan paling banyak positif flavonoid adalah fraksi metanol, sedangkan fraksi n-heksana semua negatif. Fraksi metanol dipilih untuk dilakukan kromatografi kolom dan uji aktivitas antioksidan. Mengingat adanya uji aktivitas antioksidan dan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan bukan flavonoid saja, maka fraksi metanol dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder lainnya. Hasil skrining fitokimia fraksi metanol dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil skrining menunjukkan golongan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak etanol maupun fraksi metanol dengan tingkatan indikasinya berdasarkan pereaksi-pereaksi warna yang digunakan. Dari data Tabel 1 diketahui bahwa baik pada ekstrak etanol maupun fraksi metanol terdapat indikasi kuat akan adanya senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak etanol dan Fraksi Metanol

| Uji | Hasil Uji Ekstrak Etanol | Hasil Uji Fraksi Metanol |
|---------------------|---|---|
| Alkaloid | | |
| - Dragendorf | (+) Endapan coklat jingga, larutan kuning | (+) Endapan coklat jingga, larutan kuning |
| - Borchard | (-) Larutan keruh | (-) Larutan keruh |
| - Wagner | (+) Endapan coklat, larutan kuning | (+) Endapan coklat, larutan kuning |
| - Hager | (+) Larutan kuning semakin pekat | (+) Larutan kuning semakin pekat |
| - Mayer | (+) Endapan putih kekuningan | (+) Endapan putih kekuningan |
| Flavonoid | | |
| - NaOH | (+) Larutan merah jingga | (+) Larutan merah-jingga |
| - Bate Smith | (+) Larutan merah jingga | (+) Larutan merah-jingga |
| - Wistatter | (+) Larutan merah-jingga | (+) Larutan merah-jingga |
| Saponin | | |
| | (+) Berbusa | (+) Berbusa |
| Tannin | | |
| | (+) Larutan hijau kehitaman | (+) Larutan hijau kehitaman |
| Steroid | | |
| | (+) Larutan hijau biru | (-) Larutan hijau/tetap |
| Triterpenoid | | |
| | (-) Larutan hijau biru | (-) Larutan hijau/tetap |

Keterangan: (+) terdeteksi dan (-) tidak terdeteksi

KLT merupakan tahap pertama yang harus dilakukan sebelum dilakukan kromatografi kolom. Tujuan dilakukan KLT sebelum kromatografi kolom adalah untuk mengetahui eluen terbaik. Menurut Day dan Underwood, (2002) KLT dapat digunakan untuk isolasi senyawa murni dalam skala kecil, identifikasi senyawa secara kromatografi, pencarian eluen terbaik untuk kromatografi kolom dan analisis fraksi hasil kromatografi kolom. Fase diam KLT yang digunakan adalah plat silika gel 60 F₂₅₄. Ia bersifat polar, sehingga pelarut yang mempunyai kepolarannya rendah akan merambat terlebih dahulu mendahului pelarut yang kepolarannya lebih tinggi darinya (Markham, 1988). Eluen (fase gerak) yang digunakan secara berturut-turut adalah n-heksana (n-Hex) (1), etil asetat (EtOAc) (2), diklorometatana (DCM) (3), metanol (MeOH) (4), MeOH-n-Hex (8:2) (5), MeOH-EtOAc-n-Hex (2:1:1) (6), MeOH-EtOAc (1:1) (7), EtOAc-n-Hex (3:1) (8), EtOAc-n-Hex (2:1) (9), EtOAc-n-Hex (1:2) (10), EtOAc-n-Hex (3:2) (11), EtOAc-n-Hex (1:1) (12) dan EtOAc-DCM-n-Hex (1:1:1) (13). Hasil KLT dengan eluen tersebut secara berturut-turut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT dengan Beberapa Eluen

Berdasarkan hasil KLT menggunakan beberapa eluen tersebut (Gambar 1) yang diamati secara langsung, terdapat 3 eluen yang menghasilkan pemisahan noda paling banyak yaitu EtOAc-n-Hex (1:1), EtOAc-n-Hex (3:2) dan EtOAc-DCM-n-Hex (1:1:1). Hasil KLT ketiga eluen tersebut dipilih untuk diamati dibawah lampu UV 254 nm dan 365 nm dan dihitung harga R_f, sehingga dapat ditentukan eluen mana yang terbaik. Menurut Day dan Underwood, (2002) eluen terbaik adalah eluen yang menghasilkan paling banyak noda yang tidak berekor dan mempunyai perbedaan harga R_f yang cukup lebar. Harga R_f hasil KLT fraksi metanol dengan eluen kategori baik dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Harga R_f Hasil KLT Fraksi Metanol dengan Eluen Kategori Baik

| No | EtOAc-n-Hex (1:1) | | | EtOAc-n-Hex (3:2) | | | EtOAc-DCM-n-Hex (1:1:1) | | |
|-----|-------------------|----------------|--------|-------------------|----------------|--------|-------------------------|----------------|--------|
| | Jarak noda (cm) | R _f | λ (nm) | Jarak noda (cm) | R _f | λ (nm) | Jarak noda (cm) | R _f | λ (nm) |
| 1. | 1,9 | 0,38 | 365 | 1,9 | 0,38 | 254 | 0,6 | 0,12 | 365 |
| 2. | 1,9 | 0,38 | 254 | 1,9 | 0,38 | 365 | 0,7 | 0,14 | 254 |
| 3. | 2,4 | 0,48 | 365 | 2,3 | 0,46 | 254 | 1,1 | 0,22 | 254 |
| 4. | 2,7 | 0,54 | 254 | 2,7 | 0,54 | 254 | 1,7 | 0,34 | 254 |
| 5. | 3,7 | 0,74 | 254 | 2,8 | 0,56 | 365 | 1,9 | 0,38 | 365 |
| 6. | 4,6 | 0,92 | 254 | 3,0 | 0,6 | 254 | 2,2 | 0,44 | 254 |
| 7. | - | - | - | 3,4 | 0,68 | 254 | 2,9 | 0,58 | 365 |
| 8. | - | - | - | 3,8 | 0,76 | 254 | 2,9 | 0,58 | 254 |
| 9. | - | - | - | 4,1 | 0,82 | 254 | 3,8 | 0,76 | 254 |
| 10. | - | - | - | 4,6 | 0,92 | 365 | 4,3 | 0,86 | 254 |
| 11. | - | - | - | 4,8 | 0,96 | 254 | 4,5 | 0,90 | 254 |
| 12. | - | - | - | - | - | - | 4,8 | 0,96 | 254 |

Berdasarkan data pada Tabel 2 menunjukkan eluen terbaik yaitu EtOAc- DCM-n-Hex (1:1:1). Walaupun eluen tersebut mempunyai pemisahan yang terbaik pada KLT, tapi untuk menghasilkan pemisahan secara sempurna pada kromatografi kolom perlu ditambah eluen-eluen lain dengan meningkatkan gradien kepolaran dari rendah ke tinggi. Penambahan eluen yang lain dilakukan setelah dipastikan tidak lagi pemisahan yang berikan terhadap cuplikan oleh eluen tersebut. Eluen-eluen yang digunakan secara berturut-turut adalah EtOAc-DCM-n-Hex (10:10:10), dan EtOAc-DCM-n-Hex (8:10:12), dan EtOAc-DCM (18:12), EtOAc-DCM (17:13), EtOAc-DCM (16:14), EtOAc:DCM (12:18), DCM 100%, DCM-MeOH (8:2), DCM-MeOH (7,5:2,5), DCM-MeOH (7:3), DCM-MeOH (6:4), MeOH 100%, MeOH-H₂O (8:2), MeOH-H₂O (5:5) dan H₂O 100%. Hasil pemisahan kromatografi kolom diperoleh 43 fraksi, kemudian dilakukan KLT penggabungan dan diidentifikasi senyawa flavonoid.

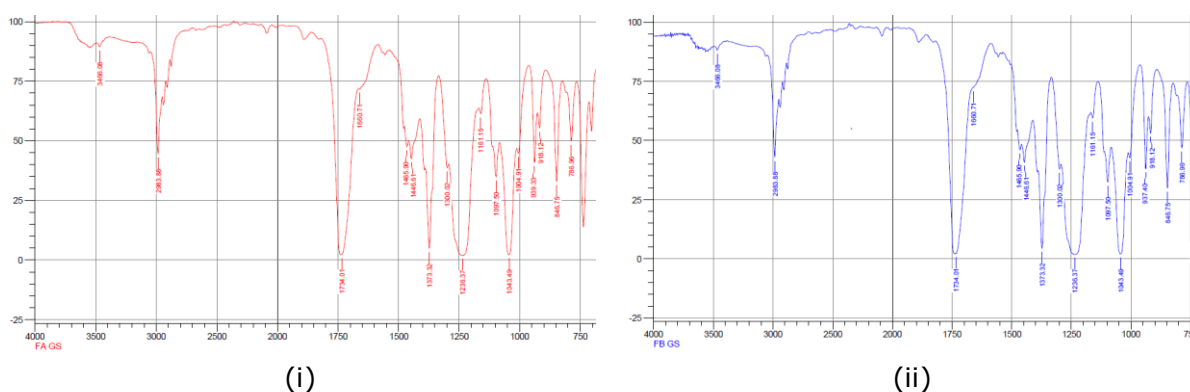
Berdasarkan hasil perlakuan kromatografi kolom, KLT penggabungan terhadap fraksi dilakukan dengan menggunakan empat macam eluen yang berbeda, yaitu EtOAc-DCM-n-Hex (1:1:1) untuk fraksi 1-8, EtOAc-DCM (1:1) untuk fraksi 8-17, DCM-MeOH (1:1) untuk fraksi 16-35 dan MeOH-H₂O (8:2) untuk fraksi 34-43. Hasil analisis KLT dari 43 fraksi dapat digabungkan menjadi 8 fraksi (A, B, C, D, E, F, G, H). Penggabungan fraksi ini di dasarkan pada bercak noda yang sama dan jarak yang sama. Fraksi A (F₁-F₄), B (F₅-F₈), C (F₉-F₁₅), D (F₁₆-F₂₂), E (F₂₃-F₂₆), F (F₂₇-F₃₃), G (F₃₄-F₄₀) dan H (F₄₁-F₄₃).

Bercak noda hasil KLT mempunyai tafsiran sendiri dalam mendeteksi suatu senyawa. Penafsiran warna bercak dari struktur flavonoid dapat diidentifikasi dengan cara diamati di bawah lampu UV 365 nm. Pengamatan dapat dilakukan pada saat sebelum disemprot NH₃ dan setelah disemprot NH₃ (Markham, 1988). Berdasarkan hasil pengamatan semua fraksi, yang menunjukkan adanya senyawa senyawa flavonoid adalah fraksi A dan B.

Fraksi A yang diamati di bawah lampu UV 365 nm tanpa NH₃ tidak terdapat bercak dan dengan NH₃ terdapat satu bercak yaitu merah lembayung. Berdasarkan kajian literatur (Markham, 1988), jenis flavonoid yang mungkin terdapat pada fraksi A adalah isoflavon. Fraksi B yang diamati di bawah lampu UV 365 nm tanpa NH₃ terdapat 2 bercak dan dengan NH₃ terdapat 3 bercak. Bercak pertama tanpa NH₃ berwarna biru muda dan dengan NH₃ warnanya biru muda dengan perubahan yang sedikit namun masih dapat

dianggap tanpa perubahan. Bercak kedua yang berada diatas bercak pertama tanpa NH_3 berwarna merah lembayung dan dengan NH_3 berwarna merah lembayung lebih terang dari warna tanpa NH_3 . Bercak ketiga yang berada di atas bercak kedua tanpa NH_3 tidak terlihat dan dengan NH_3 berwarna biru muda berflourensensi. Berdasarkan kajian literatur (Markham, 1988), jenis flavonoid yang mungkin ada pada fraksi B adalah isoflavon (ditunjukkan oleh bercak pertama dan ketiga) dan flavon, flavonol, isoflavon dan kalkon (ditunjukkan oleh bercak kedua).

Fraksi A dan B yang sudah dipastikan adanya senyawa flavonoid secara KLT dilakukan analisis FTIR untuk memperkuat bahwa fraksi tersebut benar adanya senyawa flavonoid. Analisis FTIR dilakukan untuk mendeteksi gugus fungsional yang ada dalam suatu sampel. Spektrum hasil FTIR fraksi A dan B dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. (i) Spektrum IR Fraksi A; (ii) Spektrum IR Fraksi B

Berdasarkan Gambar 2, menunjukkan bahwa fraksi A dan B memiliki gugus fungsional NH dengan jenis senyawa amina yang muncul pada bilangan gelombang 3466 cm^{-1} dan diperkuat dengan gugus CN yang muncul pada bilangan gelombang $1300, 1236, 1161, 1097, \text{ dan } 1043 \text{ cm}^{-1}$. Gugus OH dengan jenis senyawa asam karboksilat yang muncul pada bilangan gelombang 2983 cm^{-1} dan diperkuat dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang $1300, 1236, 1161, 1097, \text{ dan } 1043 \text{ cm}^{-1}$ yang menunjukkan ulur gugus CO dari senyawa karboksilat. Gugus $\text{C}=\text{C}$ alkena ditunjukkan pada bilangan gelombang 1660 cm^{-1} dan diperkuat dengan munculnya serapan pada bilangan gelombang $846 \text{ dan } 786 \text{ cm}^{-1}$ (pada fraksi A) $846, 736 \text{ dan } 704 \text{ cm}^{-1}$ (pada fraksi B) yang menunjukkan ulur gugus CH aromatik. Gugus CH alkana ditunjukkan pada bilangan gelombang 1465 cm^{-1} . Gugus $\text{C}=\text{O}$ jenis senyawa aldehyd dan ester ditunjukkan pada bilangan gelombang 1734 cm^{-1} . Gugus CX flourida ditunjukkan pada bilangan 1465 cm^{-1} (Pavia, dkk., 2009).

Karakteristik senyawa flavonoid memiliki gugus fungsi OH fenol, CH, CO, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}=\text{O}$, dan C-C. Ciri khas senyawa flavonoid ditandai dengan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$ (keton) yang muncul pada rentang bilangan gelombang $1700\text{-}1725 \text{ cm}^{-1}$ (Maulana, dkk., 2016; Darmawati, dkk., 2015). Hasil analisis FTIR fraksi A dan B tidak menunjukkan adanya serapan terhadap gugus $\text{C}=\text{O}$ keton dan gugus OH fenol. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa fraksi A dan B tidak mengandung senyawa flavonoid.

Uji aktivitas antioksidan dilakukan untuk mengetahui kemampuan sampel dalam meredam suatu radikal bebas. Larutan DPPH berwarna ungu, kemampuan suatu sampel dalam meredam radikal DPPH ditandai dengan berkurangnya intensitas warna ungu dan

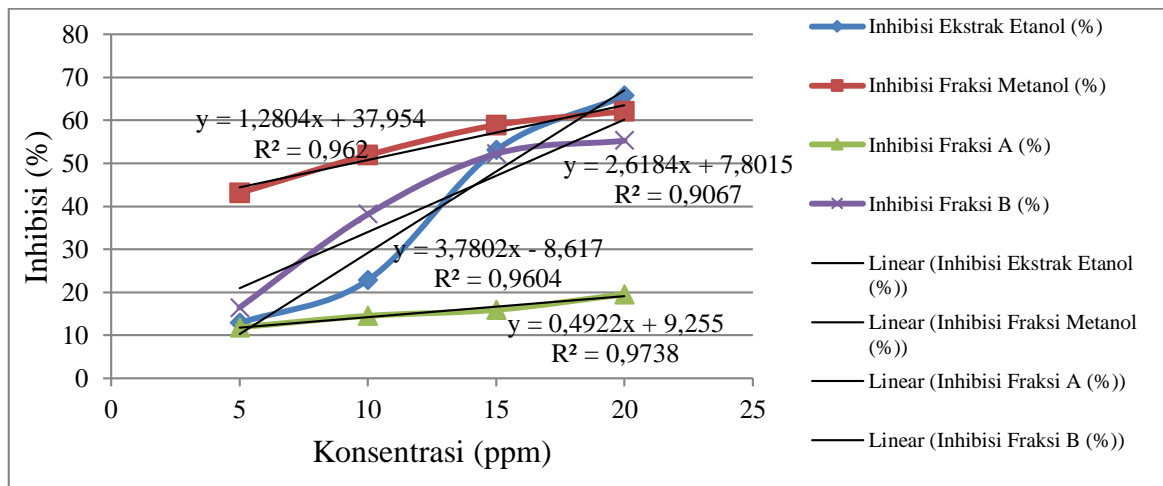
bila kemampuan peredaman kuat akan berubah menjadi kuning (Katrin, dkk., 2016). Berubahnya warna ungu menjadi kuning akibat tereduksinya DPPH oleh antioksidan dengan mendonorkan atom hidrogen sehingga terbentuk DPPH-H.

Panjang gelombang maksimum untuk larutan berwarna ungu berada pada rentang 500-560 nm (Day dan Underwood, 2002). Berdasarkan kajian literatur yang telah dilakukan panjang gelombang maksimum DPPH adalah berada pada rentang 510-520 nm, kebanyakan didapatkan pada 517, 516 dan 515 nm. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan berdasarkan hasil penentuan yaitu 510 nm, dengan absorbansi 0,47 dan %T 33,8, digunakan untuk mengukur absorbansi sampel (ekstrak etanol, fraksi metanol dan fraksi positif flavonoid (fraksi A dan B) dan perbandingan (asam askorbat). Hasil pengukuran absorbansi dan besarnya nilai persen inhibisi setiap larutan uji DPPH disajikan dalam Tabel 3.

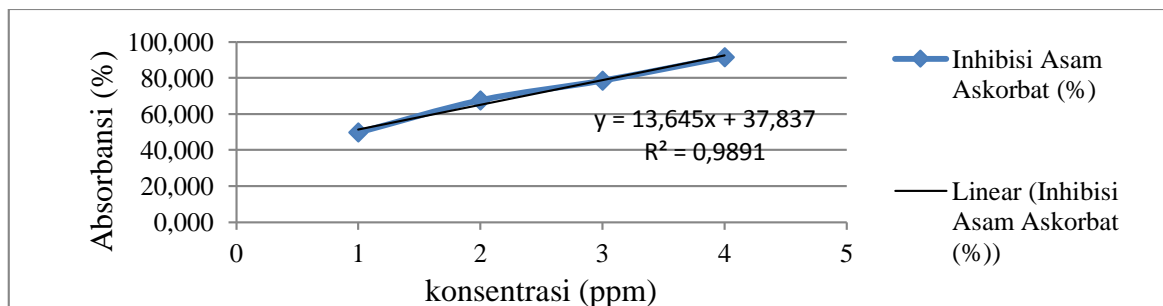
Tabel 3. Hasil Pengukuran Absorbansi dan Persentase Inhibisi Larutan Uji DPPH

| Larutan Uji | Konsentrasi (ppm) | A rata-rata | Inhibisi (%) |
|----------------|-------------------|-------------|--------------|
| Ekstrak Etanol | 5 | 0,410 | 12,837 |
| | 10 | 0,363 | 22,837 |
| | 15 | 0,220 | 53,121 |
| | 20 | 0,161 | 65,745 |
| Fraksi Metanol | 5 | 0,268 | 43,050 |
| | 10 | 0,229 | 51,865 |
| | 15 | 0,193 | 58,865 |
| | 20 | 0,178 | 62,057 |
| Fraksi A | 5 | 0,415 | 11,773 |
| | 10 | 0,402 | 14,468 |
| | 15 | 0,395 | 15,887 |
| | 20 | 0,378 | 19,504 |
| Fraksi B | 5 | 0,393 | 16,383 |
| | 10 | 0,291 | 38,156 |
| | 15 | 0,224 | 52,270 |
| | 20 | 0,210 | 55,319 |
| Asam Askorbat | 1 | 0,236 | 49,787 |
| | 2 | 0,152 | 67,730 |
| | 3 | 0,100 | 78,652 |
| | 4 | 0,039 | 91,631 |

Besarnya kemampuan peredaman radikal bebas oleh suatu sampel dinyatakan dalam persen inhibisi. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan disebut *Inhibitor concentration* (IC_{50}), ia merupakan nilai yang menggambarkan konsentrasi sampel paling efektif meredam radikal bebas 50% (Anastasia, dkk., 2016). Persen inhibisi yang telah didapatkan, digunakan untuk membuat kurva persamaan linear ($Y = ax \pm b$) dengan cara diplot konsentrasi sebagai absis (sumbu X) dan persen inhibisi sebagai ordinat (sumbu Y). Kurva hubungan konsentrasi dengan persen inhibisi dapat dilihat pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Kurva Hubungan Konsentrasi Sampel dengan Persen Inhibisi



Gambar 4. Kurva Hubungan Konsentrasi Asam Askorbat dengan Persen Inhibisi

Persamaan linear yang didapatkan dari setiap kurva digunakan untuk menentukan IC₅₀. Hasil penentuan IC₅₀ disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Penentuan IC₅₀

| Uji DPPH | Persamaan Linear | R ² | Y | IC ₅₀ (x (ppm)) |
|----------------|--------------------|----------------|----|----------------------------|
| Ekstrak Etanol | Y=3,7801x - 8,617 | 0,9604 | 50 | 15,5067 |
| Fraksi Metanol | Y=1,2936x + 37,624 | 0,9678 | 50 | 9,5671 |
| Fraksi A | Y=0,4922x + 9,1553 | 0,9737 | 50 | 82,7808 |
| Fraksi B | Y=2,6184x + 7,8014 | 0,9067 | 50 | 16,1162 |
| Asam Askorbat | Y=13,645x + 37,837 | 0,989 | 50 | 0,8914 |

Besarnya aktivitas antioksidan berbanding terbalik dengan nilai IC₅₀, artinya semakin besar aktivitas antioksidan maka semakin kecil nilai IC₅₀ yang didapatkan. Berdasarkan data pada Tabel 5, besarnya aktivitas antioksidan sampel secara berurutan dari besar ke kecil yaitu fraksi metanol > ekstrak etanol > fraksi B > fraksi A. Ekstrak etanol, fraksi metanol dan fraksi B mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat terhadap radikal DPPH 0,05 mM, dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh lebih kecil daripada 50 ppm. Fraksi A mempunyai aktivitas antioksidan kuat terhadap radikal DPPH 0,05 mM, dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh 82,7808 ppm. Hal ini sesuai dengan pernyataan Putri

dan Nurul, (2015) kuat lemahnya kekuatan aktivitas antioksidan dapat dilihat dari nilai IC_{50} . Intesitas antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} lebih kecil daripada 50 ppm, intesitas antioksidan kuat jika nilai IC_{50} 50-100 ppm, Intesitas antioksidan sedang jika nilai IC_{50} 100-250 ppm dan Intesitas antioksidan lemah jika nilai IC_{50} 250-500 ppm.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang didapatkan, dapat disimpulkan bahwa:

- 1) Ekstrak etanol daun gulma siam positif mengandung senyawa metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan steroid, sedangkan fraksi metanol positif senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin.
- 2) Isolasi dan karakterisasi senyawa flavonoid pada daun gulma siam diperkirakan fraksi A mengandung senyawa golongan isoflavon dan fraksi B mengandung senyawa golongan flavon, flavonol, isoflavon dan kalkon.
- 3) Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, diperoleh IC_{50} untuk sampel ekstrak etanol 15,5067 ppm, fraksi metanol 9,5671 ppm, fraksi A 82,7808 ppm dan fraksi B 16,2336 ppm, sedangkan untuk pembanding (asam askorbat) 0,8913 ppm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada para laboran laboratorium Pendidikan Kimia FKIP Unsyiah dan laboratorium Teknik Kimia Unsyiah yang telah membantu selama penelitian. Kemudian kepada keluarga dan teman-teman yang telah membantu doa dan memberikan dukungan sehingga penulisan ini dapat diselesaikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anastasia, M.H., Santi, S.R., dan Manurung, M. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Flavonoid pada Kulit Batang Gayam (*I. fagiferus* Fosb.). *Jurnal Kimia*, 10(1): 15-22.
- Darmawati, A.A.S.K., Bawa, I.G.A.G., dan Suirta, I.W. 2015. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Daun Nangka (*Artocarpus hetererophyllus* L.) dan Aktivitas Antibakterial terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kimia*, 9(2): 203-210.
- Day, R.A., dan Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*. Terjemahan oleh Sopyan, I. Edisi keenam. Jakarta: Erlangga.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terjemahan Kosasih, P. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hermiati, Rusli, Menalu, N.Y., dan Sinaga, M.S. 2013. Ekstrak Daun Sirih Hijau dan Merah sebagai Antioksidan pada Minyak Kelapa. *Jurnal Teknik Kimia*, 2(1): 37-43.
- Hidayah, N., Djoko, A.P., dan Isnaeni. 2014. Aktivitas Antioksidan Kombinasi Yogurt dan Jus Tomat Dibandingkan Vitamin C. *Berkala Ilmiah Kimia Farmasi*, 3(1): 41-48.
- Katrin., Elya, B., dan Shodiq, A.M. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Daun Cincin Hijau Rambat (*Cyclea barbataa* Miers.) serta Identifikasi Golongan Senyawa dari Fraksi yang Paling Aktif. *Jurnal Bahan Alam Indonesia*, 8(2): 118-124.
- Maulana, E.A., Asih, I.A., dan Arsa, M. 2016. Isolasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Daun Jambu Biji Putih (*Psidium guajava* Linn). *Jurnal Kimia*, 10(1): 161-168.
- Markham, K.R. 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Terjemahan oleh Kosasih P. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Mu'nisa, A., Wresdiyati, T., Kusunorinin, N., dan Manalu, W. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Cengkeh. *Jurnal Veteriner*, 13(3): 272-277.

- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361–167.
- Ngozi, I.M., Jude, I.C., dan Catherine, I.C. 2009. Chemical Profile of *Chromolaena* L. (King and Robinson) Leaves. *Pakistan Journal of Nutrition*, 8(5): 521-524.
- Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., dan Vyvyan, J.R. 2009. *Introduction to Spectroscopy*. Canada: Nelson Education.
- Prawiradipura, B.R. 2007. Kurinyuh (*Chromolaena odorata* (L) R.M king dan H. Robinson) Gulma Padang Rumput yang Merugikan. *Wartazoa*, 17(1): 46-52.
- Putri, S.A.A. dan Nurul, H. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry*, 4(1): 1-6.
- Ramdani, F.A., Dwiyantri, G., dan Siswaningsih, W. 2013. Penentuan Antioksidan Buah Pepaya (*Carica papaya* L) dan Produk Olahannya Berupa Manisan Pepaya. *Jurnal Sains dan Teknologi*. 4(2): 115-124.
- Rofida, S., dan Nurwahdaniati. 2015. Antibacterial Activity of *Chromolaena Odorata* (L) King Leaves With Bioautography. *Pharmacy*, 12(01): 29–36.
- Sariningsih, P., Rita, W.S., dan Puspawati, N.M. 2015. Identifikasi dan Uji Aktivitas Flavonoid dari Ekstrak Daun Trenbesi (*S. santan* (Jacq.) Merr) sebagai Pengendali Jamur *Fusarium* sp. pada Tanaman Buah Naga. *Jurnal Kimia*, 9(1): 20-26.
- Sembiring, E., Sangi, M.S., dan Suryanto, E. 2016. Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Biji Jagung (*Zea mays* L.). *Chemistry Progress Journal UNSRAT*, 9(1): 16-24.
- Zuhra, C.F., Taringa, J.B., dan Sihotang, H. 2008. Aktivitas Antioksidan Flavonoid dari Daun Katuk (*S. androgynus* (L) Merr.). *Jurnal Biologi Sumatra*, 3(1): 7-10.