

Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Batang Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dengan Metode DPPH

Imelda Afriana Putri^{1*}, Mahfur¹

¹ Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Pekalongan Jl Sriwijaya No.3, Bendan,
Kec. Pekalongan Bar., Kota Pekalongan, Jawa Tengah 51119

*Corresponding author. Email: afrianaimelda69@gmail.com

Abstract

Background: Excessive free radicals cause oxidative stress, causing oxidative damage to cells, tissues, organs, which accelerates aging and causes various diseases. Therefore, compounds are needed that can reduce the negative effects of free radicals, namely antioxidants. There are many compounds in plants that can be used to protect the body from the dangers of free radicals, one of which is patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.).

Objective: The purpose of this study was to determine the content of secondary metabolites and the antioxidant activity of 70% ethanol extract of patchouli stem (*Pogostemon cablin* Benth.) using the DPPH (2,2-diphenyl-1-pikrilhidrazyl) method.

Method: Extraction was carried out by maceration method using 70% ethanol solvent. The test began with phytochemical screening with color reagent test and antioxidant activity of 70% ethanol extract of patchouli stems carried out using the DPPH method which was measured using Uv-Vis spectrophotometry with various concentrations of 50, 100, 150, 200 and 250 ppm.

Results: The results of the phytochemical identification of the 70% ethanol extract of patchouli stems showed that the sample contained flavonoids, saponins, tannins and phenolic compounds. While testing the antioxidant activity of the 70% ethanol extract of patchouli stems had strong antioxidant activity, the average IC₅₀ value of three replications was 96,524 ppm and vitamin C as a positive control had very strong antioxidant activity, which resulted in an average IC₅₀ value of three replication of 4,035 ppm.

Conclusion: Based on the results it was found that 70% ethanol extract of patchouli stems had weaker antioxidant activity compared to vitamin C.

Keywords: Antioxidant, DPPH, Patchouli Ethanol Extract, Secondary Metabolites

Intisari

Latar belakang: Radikal bebas yang berlebihan mengakibatkan stres oksidatif sehingga menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel, jaringan, organ yang mempercepat penuaan dan timbulnya berbagai penyakit. Maka dari itu, dibutuhkan senyawa yang dapat mengurangi efek negatif dari radikal bebas yaitu antioksidan. Terdapat banyak senyawa dalam tumbuhan dapat digunakan untuk melindungi tubuh dari bahaya radikal bebas, salah satunya adalah tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.).

Tujuan: Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).

Metode: Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pengujian diawali skrining fitokimia dengan uji pereaksi warna dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70% batang nilam dilakukan dengan metode DPPH yang diukur menggunakan spektrofotometri Uv-Vis dengan variasi konsentrasi 50, 100, 150, 200 dan 250 ppm.

Hasil: Hasil penelitian dituliskan pada bagian ini termasuk angka-angka hasil pengukuran serta informasi penting mengenai hasil penelitian yang diperoleh Hasil identifikasi fitokimia ekstrak etanol 70% batang nilam menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin dan fenol. Sedangkan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol 70% batang nilam mempunyai aktivitas antioksidan kuat yang diperoleh hasil rata-rata nilai IC₅₀ dari tiga replikasi sebesar 96,524 ppm dan vitamin C sebagai kontrol positif mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat yang diperoleh hasil rata-rata nilai IC₅₀ dari tiga replikasi sebesar 4,035 ppm.

Kesimpulan: Berdasarkan hasil yang didapatkan bahwa ekstrak etanol 70% batang nilam mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih lemah dibandingkan dengan vitamin C.

Kata kunci : Antioksidan, DPPH, Ekstrak Etanol Batang Nilam, Metabolit Sekunder

1. Pendahuluan

Kehidupan manusia saat ini telah berubah seiring berjalannya waktu. Gaya hidup yang banyak berubah adalah pola makan. Pola makan yang tidak sehat dengan seringnya terpapar polutan dalam tubuh dapat menyebabkan penyakit dan kondisi degeneratif. Sebagian besar penyakit dipicu oleh reaksi oksidatif yang berlebih dalam sel-sel tubuh manusia. Radikal bebas dalam jumlah berlebihan menyebabkan stres oksidatif. Kondisi ini dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada sel, jaringan hingga organ yang mempercepat penuaan dan timbulnya berbagai penyakit [1].

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang mengandung satu atau lebih elektron tidak berpasangan, yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif [2]. Maka dari itu, dibutuhkan senyawa antioksidan yang dapat mengurangi efek negatif dari radikal bebas. Antioksidan adalah senyawa kimia yang mendonorkan elektron kepada radikal bebas yang tidak berpasangan, sehingga mengurangi efek oksidatif radikal bebas [3]. Antioksidan yang berasal dari luar tubuh (eksogen) dapat berupa sintetik dan alami. Penggunaan antioksidan sintetik sangat dibatasi oleh pemerintah karena dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi tubuh dan bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, antioksidan alami lebih disukai karena lebih aman [4].

Terdapat banyak senyawa dalam tumbuhan dapat digunakan sebagai antioksidan eksogen alami dan telah terbukti efektif secara klinis sebagai antioksidan [3]. Salah satu senyawa tersebut adalah senyawa fenolik [5]. Tanaman obat tradisional lebih banyak digunakan di seluruh dunia daripada pengobatan modern [6]. Pemanfaatan tanaman obat telah terjadi di Asia [7], termasuk di Indonesia. Salah satu tanaman yang dikenal di masyarakat dan digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.). Berbagai negara di Asia telah lama memanfaatkan nilam sebagai obat tradisional seperti anti stress, antioksidan, anti inflamasi, dan antimikroba [8].

Beberapa penelitian sebelumnya tentang aktivitas antioksidan daun nilam dengan pelarut yang berbeda menunjukkan hasil aktivitas antioksidan dengan ekstrak air menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $60 \pm 1,18 \mu\text{g/mL}$ dan menggunakan metode ABTS dengan nilai IC_{50} sebesar $33 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$.

Sedangkan dengan ekstrak etanol menggunakan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $18 \pm 0,90 \mu\text{g/mL}$ dan menggunakan metode ABTS dengan nilai IC_{50} sebesar $20 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan yang lebih tinggi dibanding dengan ekstrak air [9]. Penelitian lainnya menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa minyak nilam mempunyai kemampuan antioksidan yang baik dengan nilai IC_{50} sebesar $22,45 \mu\text{g/mL}$ dari kota Cibinong dan $19,87 \mu\text{g/mL}$ dari kota Batu, sehingga menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang tinggi [10].

Melihat potensi antioksidan dari tanaman nilam menunjukkan tingkat aktivitas antioksidan yang tinggi, salah satu metode untuk menentukan aktivitas antioksidan dengan menggunakan radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH dipilih karena metode yang sederhana, mudah, cepat, sensitif dan hanya membutuhkan sedikit sampel untuk evaluasi aktivitas antioksidan senyawa bahan alam sehingga banyak digunakan untuk menguji kemampuan senyawa untuk bertindak sebagai donor elektron [11]. Berdasarkan uraian tersebut, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mencari informasi lebih dalam mengenai tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) terutama bagian batang.

2. Metode

2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah Tabung reaksi (*Iwaki*®), rak tabung, timbangan analitik (*Ohaus*®), peralatan gelas (*Pyrex*®), botol gelap, batang pengaduk, penjepit tabung, pipet tetes, mikropipet (*Socorex*®), cawan, kaca arloji, sudip, sendok tanduk, ayakan, penggiling, kain flannel, termometer kimia, aluminium foil (*Klinpak*®), corong kaca (*Pyrex*®), kertas saring (*Whatman*), moisture analyzer (*AND MX-50*), kompor listrik (*Maspion*), spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu UV-1780*), kuvet, rotary evaporator (*Scilogex*®) dan hotplate magnetic stirrer (*Bante Instrument*).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah Simplisia batang nilam, etanol 70%, etanol p.a (*Smart Lab*), aquadest (*Onemed*), serbuk Magnesium (*Merck*), pereaksi Mayer dan Dragendorff, kloroform, amil alkohol, H_2SO_4 pekat, HCl pekat, $FeCl_3$ 1%, HCl 1N, HCl 2N (*Merck*), asetat anhidrida, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (*Himedia*), vitamin C (*Merck*), kafein (*Sigma Aldrich*), kuersetin (*Sigma Aldrich*), saponin, tanin (*Merck*), asam galat (*Sigma Aldrich*) dan Beta-sitosterol (*Sigma Aldrich*).

2.2. Langkah penelitian

2.2.1. Pengambilan Sampel

Batang nilam diambil di sekitar perkarangan liar Desa Cawet Kecamatan Watukumpul Kabupaten Pemalang.

2.2.2. Determinasi Tanaman

Batang nilam dideterminasi untuk mengetahui identitas dari tanaman. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Pembelajaran Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan Universitas Ahmad Dahlan.

2.2.3. Pembuatan Simplisia

Batang nilam dilakukan sortasi basah lalu dicuci bersih dan ditiriskan. Setelah itu, batang nilam dikeringkan di bawah sinar matahari langsung sampai kering. Selanjutnya simplisia dihaluskan dengan cara digiling lalu diayak sampai diperoleh serbuk. Serbuk batang nilam kemudian ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup [12].

2.2.4. Ekstraksi Sampel

Sampel ekstrak batang nilam sebanyak 250 gram yang telah halus dimaserasi menggunakan 2500 mL etanol 70% selama 2 x 24 jam. Filtrat yang dihasilkan dilanjutkan dengan proses evaporasi pada suhu 50°C dan pemanasan menggunakan waterbath pada suhu ±60°C sehingga diperoleh ekstrak kental [13]. Hasil ekstrak kental yang diperoleh dihitung kadar air dan rendemennya.

2.2.5. Identifikasi Fitokimia

a. Alkaloid

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 1 mL HCl 2N dan 9 mL aquadest, kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan lalu disaring, digunakan filtrat untuk uji alkaloid, diambil 2 buah tabung reaksi, lalu dimasukkan 2 mL filtrat ke dalam masing-masing tabung reaksi, ditambahkan masing-masing 5 tetes reagen Mayer dan Dragendorff ke dalam tabung reaksi. Apabila terbentuk endapan menunjukkan alkaloid, dengan pereaksi Mayer memberikan endapan berwarna putih dan pereaksi Dragendorff memberikan endapan berwarna jingga [14].

b. Flavonoid

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 2 mL aquadest dan dipanaskan selama 5 menit dengan suhu dijaga agar tidak lebih dari 50°C lalu saring. Tambahkan 0,5 mg serbuk Mg, 1 mL HCl dan 1 mL amil alkohol kemudian kocok dengan kuat. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada larutan sampel [13].

c. Saponin

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 10 mL air panas sambil dikocok selama 1 menit, lalu ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Bila busa yang terbentuk tetap stabil \pm 7 menit, maka ekstrak positif mengandung saponin [15].

d. Tanin

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan aquadest yang dipanaskan selama 5 menit lalu saring kedalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 3 tetes FeCl₃ 1% [13]. Hasil yang positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman atau hijau kehitaman [16].

e. Fenol

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan larutan FeCl₃ 1% sebanyak 10 tetes. Hasil yang positif akan menimbulkan warna biru atau hijau kehitaman [17].

f. Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 40 mg ekstrak ditambahkan 1 mL kloroform lalu tambahkan 1 mL asetat anhidrida dan 0,4 mL tetes H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Hasil positif steroid ditunjukkan dengan warna hijau kebiruan sedangkan adanya senyawa triterpenoid ditunjukkan dengan warna orange, jingga kecoklatan atau ungu [18].

2.2.6. Uji Aktivitas Antioksidan

a) Pembuatan Larutan Baku Induk DPPH 100 ppm

Ditimbang 10 mg senyawa DPPH lalu dimasukkan ke dalam gelas kimia dan ditambahkan pelarut etanol p.a secukupnya, diaduk sampai larut. Setelah itu, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL lalu ditambahkan pelarut etanol p.a sampai tanda batas, digojok hingga homogen [19].

b) Pembuatan Larutan Baku Kerja DPPH 40 ppm

Dari larutan baku induk DPPH 100 ppm dipipet sebanyak 40 ml lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan pelarut etanol p.a sampai tanda batas, digojok hingga homogen [19].

c) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan baku DPPH 40 ppm dipipet sebanyak 3 mL lalu diamati serapannya pada rentang panjang gelombang 400-600 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis [20].

d) Penentuan *Operating Time*

Dipipet larutan Vitamin C konsentrasi 3 ppm sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 2 mL, lalu

dihomogenkan dan diukur absorbansinya tiap 5 menit selama 60 menit pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh [21].

e) Uji Kesesuaian Sistem

Dipipet larutan Vitamin C konsentrasi 3 ppm sebanyak 1 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 2 mL, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Setelah itu, larutan diukur serapannya sebanyak 6 kali pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh lalu dihitung nilai RSD [22].

f) Pembuatan Larutan Blanko

Dipipet 2 mL larutan DPPH 40 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan etanol p.a sebanyak 1 mL, lalu diinkubasi selama 15 menit. Kemudian serapan larutan blanko diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh [20].

g) Pembuatan Larutan Vitamin C 100 ppm

Sebanyak 5 mg serbuk vitamin C dimasukkan ke dalam gelas kimia, ditambahkan pelarut etanol p.a secukupnya, diaduk sampai larut. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan pelarut etanol p.a sampai tanda batas, digojok hingga larut [20].

h) Pembuatan Seri Konsentrasi Vitamin C

Dari larutan induk vitamin C 100 ppm dipipet sebanyak 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 dan 0,5 mL, lalu dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 10 mL dan ditambahkan pelarut etanol p.a sampai tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi 1; 2; 3; 4 dan 5 ppm [20].

i) Pengukuran Absorbansi Vitamin C

Masing-masing seri konsentrasi larutan pembanding vitamin C (1; 2; 3; 4 dan 5 ppm) dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 2 mL, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Selanjutnya diukur serapan larutan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali [20].

j) Pembuatan Larutan Induk Ekstrak 1000 ppm

Ditimbang 50 mg ekstrak etanol 70% batang nilam lalu dimasukkan ke gelas kimia dan ditambahkan pelarut etanol p.a secukupnya, diaduk sampai larut. Kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditambahkan dengan pelarut etanol p.a sampai tanda batas, digojok hingga larut [20].

k) Pembuatan Seri Konsentrasi Ekstrak

Dari larutan induk ekstrak etanol 70% batang nilam dipipet 0,5; 1; 1,5; 2 dan 2,5 mL lalu dimasukkan ke dalam masing-masing labu ukur 5 mL dan ditambahkan dengan pelarut etanol p.a hingga tanda batas. Sehingga diperoleh konsentrasi 50; 100; 150; 200 dan 250 ppm [20].

1) Pengukuran Absorbansi Ekstrak

Masing-masing seri konsentrasi larutan uji ekstrak etanol 70% batang nilam (50; 100; 150; 200 dan 250 ppm) dipipet sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan larutan DPPH 40 ppm sebanyak 2 mL, kemudian diinkubasi selama 15 menit. Setelah itu, diukur serapan masing-masing larutan pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh. Dilakukan replikasi sebanyak 3 kali [20].

2.3. Analisa Data

2.3.1. Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan persen inhibisi yang dihitung berdasarkan rumus [15]:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

2.3.2. Penentuan IC_{50}

Besarnya aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC_{50} yang dihitung menggunakan persamaan regresi linear.

$$y = bx + a$$

Keterangan:

y = 50

x = konsentrasi larutan uji

a = tetapan slope

b = tetapan intersep

Apabila hasil nilai IC_{50} yang diperoleh kecil maka aktivitas antioksidan semakin kuat, begitu juga sebaliknya.

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Ekstraksi Sampel

Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi. Pemilihan etanol 70% sebagai penyari karena sangat efektif dalam menghasilkan jumlah bahan aktif yang optimal, dimana zat balast hanya sedikit tertarik kedalam cairan pengestrakan [23]. Ekstrak etanol 70% batang nilam yang dihasilkan memiliki karakteristik yaitu ekstrak berwarna coklat kehitaman, bentuk

ekstrak kental dan berbau khas. Hasil ekstrak etanol 70% batang nilam dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil Ekstrak Etanol 70% Batang Nilam

Hasil akhir dari proses maserasi penelitian ini didapatkan ekstrak kental sebanyak 16,72 g dengan persen rendeman sebesar 6,68% seperti pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Batang Nilam

Bobot Simplisia	Bobot Ekstrak Kental	Rendeman	Kadar Air
250 g	16,72 g	6,68%	7,54%

Nilai rendeman tersebut menunjukkan sebanyak 6,68% senyawa zat aktif yang dapat tertarik oleh pelarut dengan menggunakan metode maserasi. Besar kecilnya hasil nilai rendeman yang didapatkan dipengaruhi oleh keefektifan dalam proses ekstraksi. Faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi yaitu waktu ekstraksi, jenis pelarut, suhu, serta perbandingan bahan dan pelarut [24]. Hasil pengukuran kadar air ekstrak etanol 70% batang nilam yang diperoleh sebesar 7,54%, dimana hasil tersebut memenuhi persyaratan mutu kadar air ekstrak yaitu $\leq 10\%$ [25].

3.2. Identifikasi Fitokimia

Identifikasi fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol 70% batang nilam. Dimana pada penelitian yang telah dilakukan batang nilam positif mengandung flavonoid, saponin, tanin dan fenol. Hasil identifikasi fitokimia secara keseluruhan ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Identifikasi Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Batang Nilam

Identifikasi Senyawa	Pereaksi	Hasil Positif	Hasil Pengamatan		Ket
			Pembanding	Sampel	
Alkaloid	Mayer	Endapan berwarna putih	Terbentuk endapan berwarna putih	Terbetuk endapan berwarna coklat kehijauan	(-)
	Dragendorff	Endapan berwarna jingga	Terbentuk endapan berwarna jingga	Terbentuk endapan berwarna coklat	(-)
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl	Warna merah, kuning atau	Terbentuk larutan berwarna	Terbentuk larutan berwarna	(+)

	+ amil alkohol	jingga	kuning	kuning	
Saponin	Air panas + HCl 1N	Bila busa yang terbentuk tetap stabil \pm 7 menit	Terbentuk busa yang stabil saat didiamkan selama 7 menit	Terbentuk busa yang stabil saat didiamkan selama 7 menit	(+)
Tanin	Aquadest + FeCl ₃ 1%	Warna biru kehitaman atau hijau kehitaman	Terbentuk larutan berwarna biru kehitaman	Terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman	(+)
Fenol	FeCl ₃ 1%	Warna biru atau hijau kehitaman	Terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman	Terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman	(+)
Steroid/ Triterpenoid	Kloroform + asetat anhidrida + H ₂ SO ₄	Steroid: hijau kebiruan & Triterpenoid: orange, jingga kecoklatan atau ungu	Terbentuk larutan 3 lapisan berwarna ungu, hijau dan jingga	Terbentuk larutan berwarna coklat kehitaman	(-)

Keterangan:

(+) = mengandung golongan senyawa

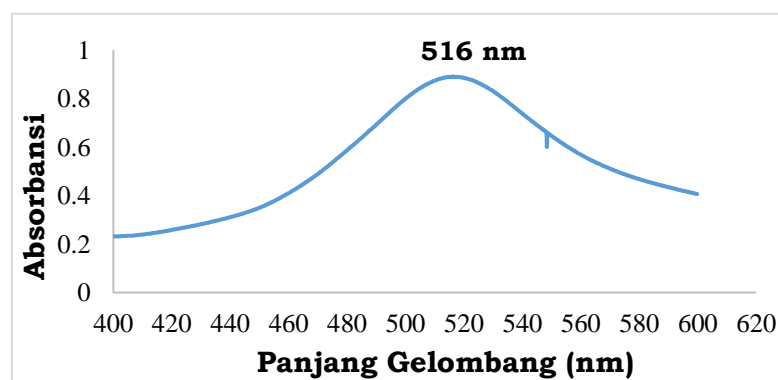
(-) = tidak mengandung golongan senyawa

3.3. Uji Aktivitas Antioksidan

Penentuan nilai aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis.

3.3.1. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum larutan baku DPPH dilakukan dengan mengukur serapan larutan DPPH 40 ppm pada rentang panjang gelombang 400–600 nm. Hasil penentuan panjang gelombang serapan maksimum DPPH ditunjukkan pada Gambar 2.



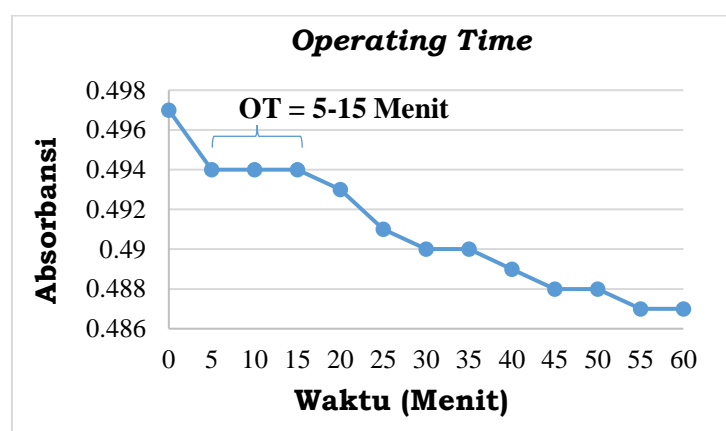
Gambar 2. Hasil Penentuan Panjang Gelombang DPPH

Pengukuran panjang gelombang maksimum larutan DPPH 40 ppm diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 516 nm dengan nilai absorbansi

sebesar 0,891. Hal ini sesuai dengan jangkauan panjang gelombang maksimum untuk pengukuran metode DPPH yaitu 515-520 nm [26].

3.3.2. Penentuan Operating Time

Operating time dilakukan dengan tujuan untuk menentukan waktu paling tepat larutan uji dalam meredam radikal bebas DPPH. *Operating time* menunjukkan bahwa reaksi antara larutan uji dan DPPH telah sempurna [27]. Penentuan *operating time* didasarkan pada waktu dimana nilai absorbansi dari larutan uji terhadap DPPH mulai stabil atau selisih absorbansi mulai kecil antara selang waktu yang diujikan. [28]. *Operating time* yang diperoleh adalah 15 menit pada λ maksimal 516 nm. Grafik penentuan *operating time* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Grafik Penentuan Operating Time

3.3.3. Uji Kesesuaian Sistem

Uji kesesuaian sistem dilakukan untuk memastikan bahwa sistem yang digunakan dapat berfungsi dengan baik, sehingga dapat memberikan hasil terbaik dan konsisten selama proses analisis. Uji tersebut dapat diterima apabila dalam pembacaan absorbansi secara berulang sebanyak 6 kali diperoleh $RSD \leq 2\%$ [22]. Hasil pembacaan spektrum pada uji kesesuaian sistem disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Kesesuaian Sistem

Nomor	Absorbansi
1	0,483
2	0,479
3	0,478
4	0,477
5	0,476
6	0,475
Rata-rata	0,478
SD	0,0028
RSD (%)	0,59

Berdasarkan hasil pembacaan uji kesesuaian sistem didapatkan nilai simpangan baku relatifnya sebesar 0,59%. Metode analisis ini memenuhi persyaratan, dimana nilai simpangan baku relatifnya $\leq 2\%$. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa alat spektrofotometer UV-Vis yang digunakan untuk analisis memiliki sistem yang stabil dalam pembacaan absorbansinya.

3.3.4. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

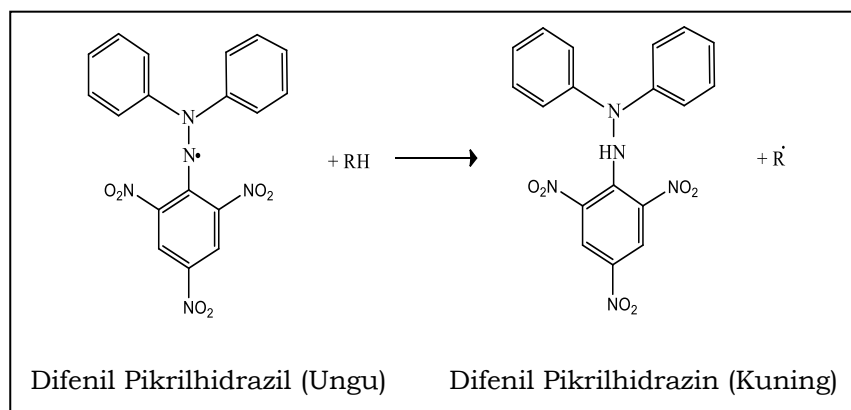
Pengukuran aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil). Metode DPPH dipilih karena metode yang sederhana, mudah, cepat, peka dan hanya membutuhkan sedikit sampel untuk mengevaluasi aktivitas antioksidan dari senyawa bahan alam sehingga banyak digunakan untuk menguji kemampuan senyawa yang berperan sebagai pendonor electron [11].

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH digunakan juga vitamin C sebagai pembanding (kontrol positif). Vitamin C berfungsi sebagai antioksidan sekunder dengan cara menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Penggunaan kontrol positif pada uji aktivitas antioksidan ini yaitu untuk mengetahui seberapa kuat potensi antioksidan yang ada pada ekstrak etanol batang nilam jika dibandingkan dengan vitamin C [29].

Pengukuran aktivitas antioksidan diawali dengan pembuatan larutan blanko dengan menggunakan DPPH. Pembuatan larutan blanko bertujuan untuk mengetahui besarnya serapan oleh larutan yang tidak mengandung analit. Kemudian pengukuran absorbansi larutan vitamin C dan larutan uji ekstrak etanol 70% batang nilam yang telah dibuat seri konsentrasi ditambahkan dengan larutan DPPH 40 ppm dan di inkubasi selama 15 menit. Tujuan dilakukan inkubasi yaitu untuk memberikan waktu terjadinya reaksi pendonoran terhadap radikal bebas yang optimum. Selama proses inkubasi terjadi reaksi antara senyawa antioksidan dengan radikal DPPH yang ditandai dengan perubahan warna larutan ungu menjadi kuning [30].

Perubahan warna ini menunjukkan bahwa senyawa sampel memiliki kemampuan sebagai antioksidan. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan dari reaksi molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikrilhidrazin dan menyebabkan degradasi warna DPPH dari ungu menjadi kuning atau dari ungu pekat menjadi ungu pudar. Perubahan warna ini menyebabkan nilai absorbansi menurun pada setiap

peningkatan konsentrasi dan terjadi peningkatan nilai % peredaman. Reaksi antara DPPH dan atom H yang berasal dari antioksidan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Reaksi antara DPPH dan atom H yang berasal dari antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan larutan pembanding dan larutan uji ekstrak etanol 70% batang nilam dilakukan dengan tiga kali replikasi. Replikasi ini dilakukan dengan tujuan agar menambah ketepatan dan mengurangi tingkat kesalahan pada saat penelitian. Hasil pengukuran absorbansi vitamin C dan ekstrak etanol batang nilam dapat dilihat pada Tabel 4 dan 5.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Vitamin C

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Abs Blanko	Abs Vit C	% Peredaman	Persamaan regresi linear
1	1	0,732	0,655	10,51%	y = 12,022x+ 1,001 R ² = 0,9843
	2		0,540	26,22%	
	3		0,435	40,57%	
	4		0,376	48,63%	
	5		0,297	59,42%	
2	1	0,731	0,647	11,49%	y = 12,242x+ 0,97 R ² = 0,9907
	2		0,536	26,67%	
	3		0,437	40,21%	
	4		0,379	48,15%	
	5		0,278	61,96%	
3	1	0,730	0,635	13,01%	y = 11,535x+ 3,555 R ² = 0,9839
	2		0,533	26,98%	
	3		0,424	41,91%	
	4		0,369	49,45%	
	5		0,296	59,45%	

Tabel 5. Hasil Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Batang Nilam

Replikasi	Konsentrasi (ppm)	Abs Blanko	Abs Vit C	% Peredaman	Persamaan regresi linear
1	50	0,733	0,423	42,29%	y = 0,1462x+ 36,232 R ² = 0,9851
	100		0,359	51,02%	
	150		0,290	60,43%	
	200		0,253	65,48%	
	250		0,208	71,62%	

2	50	0,726	0,437	39,80%	y = 0,1609x+ 33,963 R ² = 0,9743
	100		0,355	51,10%	
	150		0,287	60,46%	
	200		0,239	67,07%	
	250		0,203	72,03%	
3	50	0,730	0,426	41,72%	y = 0,1518x+ 35,468 R ² = 0,9867
	100		0,358	51,02%	
	150		0,292	60,05%	
	200		0,245	66,48%	
	250		0,205	71,95%	

Berdasarkan dari hasil pengukuran aktivitas antioksidan larutan vitamin C dan ekstrak etanol 70% batang nilam menunjukkan bahwa dengan adanya peningkatan konsentrasi larutan, maka nilai absorbansi yang dihasilkan juga semakin menurun. Semakin tinggi konsentrasi larutan maka akan semakin banyak senyawa antioksidan yang akan menjadi donor hidrogen atau elektron pada radikal DPPH sehingga terjadi perubahan warna DPPH yang menyebabkan penurunan absorbansi. Semakin tinggi konsentrasi larutan maka semakin besar nilai % peredaman yang diperoleh. Hasil dari tiga replikasi larutan pembanding vitamin C dan larutan uji ekstrak etanol 70% batang nilam tersebut, persamaan regresi linear yang dihasilkan memiliki koefisien korelasi (r) yang baik yaitu mendekati 1.

Parameter yang digunakan untuk menunjukan aktivitas antioksidan yaitu nilai IC₅₀ (Inhibition Concentration). IC₅₀ adalah konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk mengurangi radikal DPPH sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC₅₀ yang diperoleh maka aktivitas antioksidan suatu senyawa semakin tinggi, begitu juga sebaliknya apabila nilai IC₅₀ semakin besar maka aktivitas antioksidan semakin lemah. Hasil nilai IC₅₀ vitamin C dan ekstrak etanol 70% batang nilam dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil IC₅₀ Vitamin C dan Ekstrak

Sampel	Replikasi	Nilai IC₅₀ (ppm)	\bar{x} (ppm) ± SD
Vitamin C	1	4,075	4,035 ± 0,035
	2	4,005	
	3	4,026	
Ekstrak	1	94,172	96,524 ± 2,833
	2	99,670	
	3	95,731	

Berdasarkan hasil yang diperoleh menunjukkan ekstrak etanol 70% batang nilam memiliki IC₅₀ yaitu 96,524 ppm dengan kategori aktivitas antioksidan kuat sedangkan vitamin C memiliki IC₅₀ yaitu 4,035 ppm dengan kategori aktivitas antioksidan sangat kuat. Hal ini dapat diketahui bahwa ekstrak etanol 70% batang nilam lebih lemah dibandingkan dengan vitamin C sebagai baku pembandingnya.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut:

- a. Ekstrak etanol 70% batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid, saponin, tanin dan fenol.
- b. Ekstrak etanol 70% batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) memiliki aktivitas antioksidan yang diuji dengan metode DPPH.
- c. Nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol 70% batang Nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) terhadap DPPH sebesar 96,524 ppm dan vitamin C sebesar 4,035 ppm.

Daftar pustaka

- [1] E. R. Yuslianti, *Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan*. Yogyakarta: Deepublish, 2018.
- [2] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, dan L. Periyasamy, "Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases," *Indian J. Clin. Biochem.*, vol. 30, no. 1, hal. 11–26, 2015, doi: 10.1007/s12291-014-0446-0.
- [3] R. Amorati dan L. Valgimigli, "Methods To Measure the Antioxidant Activity of Phytochemicals and Plant Extracts," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 66, no. 13, hal. 3324–3329, 2018, doi: 10.1021/acs.jafc.8b01079.
- [4] A. N. Wulansari, "Alternatif Cantigi Ungu (*Vaccinium varingiaefolium*) Sebagai Antioksidan Alami: Review," *Farmaka*, vol. 16, no. 2, hal. 419–429, 2018.
- [5] J. Sukweenadhi *dkk.*, "Antioxidant Activity Screening of Seven Indonesian Herbal Extract," *Biodiversitas*, vol. 21, no. 5, hal. 2062–2067, 2020, doi: 10.13057/biodiv/d210532.
- [6] S. Prabhu dan S. Vijayakumar, "Ethnobotanical Study of Traditionally Used Medicinal Plants in Malayali Ethnic People of," vol. 2, no. 1, hal. 39–42, 2016.
- [7] P. Wangchuk dan T. Tobgay, "Contributions of medicinal plants to the Gross National Happiness and Biodiscovery in Bhutan," *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, vol. 11, no. 1, 2015, doi: 10.1186/s13002-015-0035-1.
- [8] M. Silalahi, "Botani, Manfaat, dan Bioaktivitas Nilam *Pogostemon cablin*," *J. EduMatSains*, vol. 4, no. 1, hal. 29–40, 2019.
- [9] B. Dechayont, P. Ruamdee, S. Poonnaimuang, K. Mokmued, dan J. Chunthorng-Orn, "Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.," *J. Bot.*, vol. 2017, 2017, doi: 10.1155/2017/8310275.
- [10] Hariyanti, E. Hanani, dan D. Y. Dayatri, "Phytochemical identification and antioxidant activity of essential oil of *Pogostemon cablin* benth. cultivated in Java Island Indonesia," *Int. J. Phytopharm.*, vol. 9, no. 6, hal. e5297, 2019, doi: 10.7439/ijpp.v9i6.5297.
- [11] E. Al Ridho, R. Sari, dan S. Wahdaningsih, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Buah Lakum (*Cayratia Trifolia*) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)," *Naskah Publ. Progr. Stud. Farm. Fak. Kedokt. Univ.*

- Tanjungpura Pontianak*, hal. 13, 2013.
- [12] J. Rohmah, I. A. Saidi, C. S. Rini, D. A. Masyitha, D. N. Ramadhani, dan H. P. Wulandari, "Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat, Dan n-Heksana Batang Turi Putih (*Sesbania grandiflora* (L.) Pers.) Dengan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)," *J. Kim. Ris.*, vol. 5, no. 1, hal. 67, 2020, doi: 10.20473/jkr.v5i1.20900.
- [13] N. Agustikawati, Y. Andayani, dan D. Suhendra, "Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penapisan Fitokimia Dari Ekstrak Daun Pakoasi Dan Kluwih Sebagai Sumber Antioksidan Alami," *J. Penelit. Pendidik. IPA*, vol. 3, no. 2, 2017, doi: 10.29303/jppipa.v3i2.93.
- [14] I. Nurjannah, B. A. A. Mustariani, dan N. Suryani, "Skrining Fitokimia dan Uji Antibakteri Ekstrak Kombinasi Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) dan Kelor (*Moringa oleifera* L.) sebagai Zat Aktif pada Sabun Antibakteri," *Spin J. Kim. Pendidik. Kim.*, vol. 4, no. 1, hal. 23–36, 2022, doi: 10.20414/spin.v4i1.4801.
- [15] D. P. Wijaya, J. E. Paendong, dan J. Abidjulu, "Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Daun Nasi (*Phrynium capitatum*) dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil)," *J. MIPA*, vol. 3, no. 1, hal. 11, 2014, doi: 10.35799/jm.3.1.2014.3899.
- [16] Supomo, R. Supriningrum, dan R. Junaid, "Karakterisasi dan Skrining Fitokimia Daun Kerehau (*Callicarpa longifolia* Lamk.)," *J. Kim. Mulawarman*, vol. 13, no. 2, hal. 89–96, 2016.
- [17] R. A. Suwardi, H. Nurcahyo, dan Purgiyanti, "Uji Total Fenol dan Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* var. *Ascolanicum*)," Politeknik Harapan Bersama Tegal, 2019.
- [18] F. A. Q. Nada, T. Rahayu, dan A. Hayati, "Analisis Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Biji Sangrai Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dari Tanaman Hasil Pemupukan Organik dan Anorganik," *J. Ilm. SAINS ALAMI (Known Nature)*, vol. 3, no. 2, hal. 31–39, 2021.
- [19] E. Cahyaningsih, P. E. S. K. Yuda, dan P. Santoso, "Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis," *J. Ilm. Medicam.*, vol. 5, no. 1, hal. 51–57, 2019, doi: 10.36733/medicamento.v5i1.851.
- [20] Selvia, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 95% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)," *Karya Tulis Ilm.*, 2017.
- [21] D. N. Hidayati, I. Arifin, Y. Antika, A. Firdaus, dan N. K. Ardian, "Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Jantung Pisang Mas (*Musa acuminata* Colla) Menggunakan Metode DPPH," *Pharmacy*, vol. 14, hal. 75–85, 2017.
- [22] R. Ismet, B. K. Raeis, dan Sriwulan, "Validasi Metode Penetapan Kadar fe Gluconate dalam Obat Secara Spektrofotometri UV-Vis," *J. Ilm. Tek. Kim.*, vol. 6, no. 1, hal. 39–47, 2022.
- [23] R. Voight, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Yogyakarta: Yogyakarta: Gajah Mada University Press, 1994.
- [24] S. Chairunnisa, N. M. Wartini, dan L. Suhendra, "Pengaruh Suhu dan Waktu

- Maserasi terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) sebagai Sumber Saponin,” *J. Rekayasa Dan Manaj. Agroindustri*, vol. 7, no. 4, hal. 551, 2019, doi: 10.24843/jrma.2019.v07.i04.p07.
- [25] A. Yulianingtyas dan B. Kusmartono, “Optimasi Volume Pelarut Dan Waktu Maserasi Pengambilan Flavonoid Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi* L.),” *J. Tek. Kim.*, vol. 10, hal. 58–64, 2016, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.annemergmed.2013.08.024>.
- [26] P. Molyneux, “The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity,” *Songklanakarinn J. Sci. Technol.*, vol. 26, no. 2, hal. 211–219, 2004.
- [27] U. Rastuti dan Purwati, “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kalba (*Albizia falcataria*) Dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2 pikrilhidrazil) Dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekundernya,” *Molekul*, vol. 7, no. 1, hal. 33, 2012, doi: 10.20884/1.jm.2012.7.1.104.
- [28] W. D. Patria dan C. J. Soegihardjo, “Uji Aktivitas Antioksidan Menggunakan Radikal 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH) Dan Penetapan Kandungan Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Benalu (*Dendrophthoe pentandra* L. Miq.) Yang Tumbuh Di Pohon Kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl.),” *J. Farm. Sains Dan Komunitas*, vol. 10, no. 1, hal. 51–60, 2013.
- [29] S. Afriani, N. Idiawati, L. Destiarti, dan L. Arianie, “Uji Aktivitas Antioksidan Daging Buah Asam Paya (*Eleiodoxa conferta* Burret) Dengan Metode DPPH Dan Tiosianat,” *JKK*, vol. 3, no. 1, hal. 49–56, 2014, [Daring]. Tersedia pada: <http://ci.nii.ac.jp/naid/40016459439>.
- [30] I. Martiani, I. F. Azzahra, dan F. Perdana, “Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat, Dan Metanol Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.),” *J. Ilm. Farm. Bahari*, vol. 8, no. 2, hal. 31, 2017, doi: 10.52434/jfb.v8i2.783.