

Research Article

Determination of Polifenol Content and Antioxidant Activity Test of Ethanol Extract 70% Awar-Awar (*Ficus septica* Burm. F) Leaf using DPPH Method (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

Kadar Polifenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 70% Daun Awar-Awar (*Ficus septica* Burm. F) dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

Devi Sahyuni Putri Koto, Mustofa Ahda, Zainab, Any Guntarti*

Faculty of Pharmacy, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta 55164 Indonesia

*Corresponding author: Any Guntarti | Email: any_guntarti@yahoo.co.id

Received: 8 August 2019; Revised: 22 August 2019; Accepted: 25 September 2019; Published: 29 September 2019

Abstract: Free radicals are molecules with unpaired electrons that can react with body cell molecules. As a result, cell became damaged or death because oxidation of the lipid components of cell membranes, proteins and DNA. The purpose of this study was to determine the antioxidant activity test, and total polyphenol content. The ethanol extract was done by phytochemical screening by KLT method and the antioxidant activity was performed with DPPH. The extract were obtained from 200 gram awar-awar leaf powder was macerated with 70% ethanol. Antioxidant activity was measured by DPPH purple color change. The antioxidant activity parameter was the ES50 yes obtained from the linear regression equation between the concentration and the percent of the damping. The results of phytochemical screening test of the awar-awar leaf ethanol extract showed that the sample contained flavonoid and polyphenol compounds. Determination of total phenolic content of $8,11 \pm 0,364\%$ EAG. The potential of antioxidant can be seen from the price of ES50, the value of ES50 standard quercetin of $4,542 \pm 0,0767 \mu\text{g} / \text{mL}$, ethanol extract of $21,19 \pm 0,565 \mu\text{g} / \text{mL}$. Data analyzed with non parametric test Krukall Wallis with 95% showed the result of ES50 of ethanol extract of awar-awar leaves was significantly different with ES50 quercetin. Conclusion of this research were ethanol extract 70% of awar-awar leaves had a total polyphenol content of 8.11% equivalents of gallic acid, and antioxidant activity of $21.19 \mu\text{g} / \text{mL}$ with very strong antioxidant strength, ie $\text{ES}_{50} < 50 \mu\text{g} / \text{mL}$, while the standard quercetin was $4,542 \mu\text{g} / \text{mL}$. Polyphenol compounds support the antioxidant activity of the extract.

Keywords : antioxidant; awar-awar leaf; DPPH; ethanol

Abstrak: Radikal bebas adalah molekul dengan elektron tak berpasangan yang dapat bereaksi dengan molekul sel tubuh. Akibatnya, terjadi kerusakan atau kematian sel karena senyawa radikal bebas mengoksidasi dan menyerang komponen lipid membran sel, protein dan DNA. Tujuan dari penelitian ini menguji kadar polifenol total uji aktivitas antioksidan daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F). Ekstrak etanol diskriminasi fitokimia dengan metode KLT, selanjutnya dilakukan penetapan kadar total polifenol, dan uji aktivitas antioksidan dengan DPPH. Hasil uji skrining fitokimia dari ekstrak etanol daun awar-awar menunjukkan bahwa sampel mengandung senyawa flavonoid dan polifenol. Kadar senyawa total polifenol sebesar $8,11 \pm 0,364\%$ EAG. Potensi antioksidan dengan parameter nilai ES_{50} standar kuersetin ($4,542 \pm 0,077$) $\mu\text{g}/\text{mL}$, ekstrak etanol daun awar-awar ($21,190 \pm 0,565$) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Kandungan total polifenol mempengaruhi besarnya

potensi antioksidan ekstrak daun awar-awar. Potensi antioksidan ekstrak etanol daun awar-awar termasuk sangat kuat yaitu nilai $ES_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$.

Kata kunci : antioksidan; daun awar-awar; DPPH; etanol

1. PENDAHULUAN

Penyakit-penyakit degeneratif dan penuaan dini merupakan penyakit tidak menular yang berlangsung kronis yang disebabkan oleh kerusakan jaringan. Proses oksidasi dapat menyebabkan terbentuknya suatu oksidan atau radikal bebas yang berbahaya bagi tubuh [1]. Kerusakan jaringan tersebut menyebabkan timbulnya berbagai macam penyakit degeneratif seperti kanker, aterosklerosis, diabetes mellitus, dan jantung koroner [2].

Antioksidan alami adalah antioksidan yang berasal dari hasil ekstraksi bahan alam pada tumbuhan. Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan adalah daun Awar awar. Daun awar-awar (*Ficus septica* Burm.F) mengandung senyawa flavonoid genistin dan kaempferitrin, kumarin, senyawa fenolik, pirimidin dan alkaloid antofin, 10S, 13aR-antofin N-oxide, *dehydrotylophorine*, *ficuseptin A*, *tylophorine*, *2-Demetoksitylophorine*, *14 α -Hydroksiisotyloprebin N-oxide*, saponin triterpenoid, sterol [3-5].

Berdasarkan penelitian, alkaloid *tylophorine* dalam daun awar-awar memiliki efek sitotoksik terhadap sel kanker [6]. Selain itu, penelitian Yang *et al.*, (2005) menyebutkan daun tanaman ini memiliki efek antiinflamasi melalui penghambatan *inducible nitric oxidesynthase* (iNOS) yang terkait erat dengan mekanisme penghambatan siklooksigenase-2 (COX-2) [7]. Selain itu, COX-2 juga mensintesis prostaglandin E2 (PGE2) untuk menstimulasi Bcl-2 dan menghambat apoptosis [8]. COX-2 menghambat pro-apoptosis yaitu protein p53 sehingga tidak terjadi apoptosis [9]. Oleh karena itu, peneliti ingin mengembangkan kandungan polifenol dan uji aktivitas antioksidan dalam daun awar-awar.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Bahan

Sampel yang digunakan adalah herbal awar-awar yang diperoleh dari Merapi Farma herbal, Kaliurang pada bulan Februari tahun 2018.

2.2. Pengambilan sampel

Daun awar-awar diambil dari Merapi Farma herbal, Kaliurang, difenilpikril hidrazil hidrat (DPPH), etanol p.a (Sigma-Aldrich), aquadest, amoniak, Toluena jenuh air, FeCl_3 , reagen Folin-ciocalteu (Merck), Na_2CO_3 (Merck), kuersetin (Sigma-Aldrich), dan etanol 70 % (Sigma-Aldrich).

2.3. Pengeringan dan pembuatan serbuk

Daun yang dipanen dicuci dengan air untuk menghilangkan kotoran, dikeringkan dengan oven pada suhu C. Bahan yang telah kering diserbuk dan diayak berukuran 50/60 mesh. Hasil penyerbukan yang berupa serbuk kering dan tertutup rapat yang selanjutnya digunakan untuk penelitian [10].

2.4. Pembuatan ekstrak

Metode ekstraksi dengan maserasi sederhana menggunakan pelarut etanol 70%, tanpa pengaduk otomatis atau tanpa pengaturan suhu. Sebanyak 200 gram serbuk daun awar-awar

ditimbang kemudian dimaserasi dengan 1,5 L etanol 70% pada suhu kamar selama 5 hari. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian ditimbang bobotnya.

2.5. Penetapan kadar air

Penetapan kadar air mengacu pada Farmakope Indonesia [11].

2.6. Skrining fitokimia

2.6.1. Uji kandungan senyawa alkaloid

Ekstrak etanol dibuat konsentrasi 1 mg/ml dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 3 ml kemudian ditambahkan dengan dua tetes larutan pereaksi Mayer. Hasil positif apabila terbentuk endapan putih atau kuning. Kemudian sebanyak 3 ml dimasukkan dalam tabung reaksi ditambah dengan pereaksi Dragendorff, apabila positif terbentuk endapan merah atau jingga [12].

2.6.2. Uji kandungan senyawa flavonoid

Sebanyak 1,0 ml sampel dengan konsentrasi 1 mg/ml diteteskan pada kertas saring kemudian dikeringkan. Kertas saring yang telah kering diuapi menggunakan uap amoniak [13].

2.6.3. Uji kandungan senyawa polifenol

Sebanyak 1,0 ml sampel ditambah dengan pereaksi $FeCl_3$ sebanyak 3 tetes [14].

2.7. Uji penetapan kadar polifenol total

Analisis Kuantitatif polifenol total diawali dengan penentuan *operating time*, panjang gelombang serapan maksimum, kurva baku, dan penetapan kadar. Pereaksi yang digunakan adalah reagen Folin-Ciocalteu (1:10), larutan Na_2CO_3 7,5 % [15].

2.8. Uji antioksidan

2.8.1. Uji daya antioksidan dengan kromatografi lapis tipis

Fase diam silika gel F- 254 dengan optimasi fase gerak TBA (Toluen : Butanol : Asam Asetat) hingga didapat fase gerak yang menghasilkan pemisahan terbaik [16]. Kromatogram yang dihasilkan dideteksi aktivitas antioksidan dengan cara disemprotkan DPPH 0,15 mM.

2.8.2. Uji aktivitas antioksidan

Pembandingan yang digunakan adalah kuersetin, diawali dengan penentuan *operating time* larutan DPPH 0,1 Mm, panjang Gelombang Serapan maksimal Larutan DPPH 0,1 mM [17].

2.8.3. Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Masing-masing 1,0 mL ekstrak etanol daun awar-awar dan larutan pembandingan kuersetin dengan berbagai konsentrasi dikocok kuat dengan 1,0 mL larutan DPPH 0,15 mM. Campuran larutan tersebut disimpan ditempat gelap selama *operating time*. Kemudian absorbansinya diukur pada *operating time* dan panjang gelombang serapan maksimal yang diperoleh DPPH dengan spektrofotometer UV-Vis [17].

2.8.4. Analisis data

Data yang diperoleh adalah data absorbansi larutan DPPH sisa yang tidak bereaksi dengan sampel. Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase (%) Penangkapan radikal bebas dengan menggunakan rumus [17] :

$$\% \text{ Penangkapan radikal bebas} = \frac{(\text{Absorban blanko} - \text{Absorban sampel})}{\text{Absorban blanko}} \times 100 \%$$

Harga persen penangkapan radikal bebas yang diperoleh kemudian digunakan untuk menentukan nilai ES_{50} (*Effective scavenging*).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

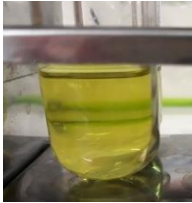

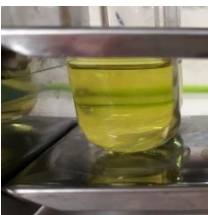
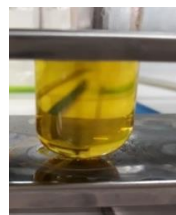

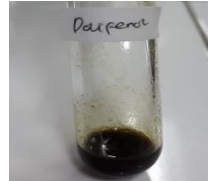
3.1. Penetapan kadar air dan skrining kimia

Penetapan kadar air ekstrak etanol daun awar-awar dilakukan dengan destilasi toluen. Hasil penetapan kadar air rata-rata ekstrak diperoleh $(5,89 \pm 0,89)\%$, hal ini sesuai dengan kadar air yang dipersyaratkan yaitu $< 10\%$. Serbuk simplisia dianggap memenuhi syarat simplisia standar untuk meminimalisir tumbuhnya jamur dan kapang.

Skrining fitokimia Alkaloid dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff, hasil uji positif alkaloid dengan pereaksi Mayer, terbentuk endapan putih/kekuningan. Hal ini karena nitrogen alkaloid bereaksi dengan anion tetraiodomerkurat dari kalium tetratiodomerkurat (II) membentuk kompleks alkaloid-tetraiodomerkurat. Pereaksi Dragendorff dihasilkan endapan jingga karena nitrogen bereaksi dengan anion tetraiodobismutat. Hasil identifikasi polifenol dengan pereaksi $FeCl_3$ diperoleh warna hitam kebiruan menunjukkan bahwa sampel tersebut positif mengandung polifenol.

Hasil identifikasi Flavonoid dengan Uap amoniak diperoleh warna kuning intensif yang timbul menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Warna kuning tersebut disebabkan karena pembentukan struktur kinoid yang mengandung ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih panjang dan planar sehingga dapat berfluorosensi [18]. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol 70% daun awar-awar

Pereaksi	Sebelum	Sesudah	Keterangan
Meyer			Positif terbentuk endapan putih kekuningan
Dragendorff			Positif terbentuk warna jingga
$FeCl_3$			Positif terbentuk warna hitam kebiruan

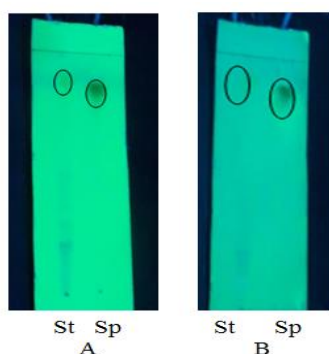
Lanjutan Tabel 1...

Uap Amoniak			Positif terbentuk warna kuning
-------------	---	--	--------------------------------------

3.2. Uji senyawa antioksidan

Uji ada senyawa antioksidan dengan menggunakan KLT. Fase gerak yang digunakan di dalam KLT diperoleh dari hasil orientasi, sehingga diperoleh fase gerak yang sesuai untuk dapat memisahkan komponen yang terkandung di dalam ekstrak etanol etanol, yaitu TBA (Toluen: Butanol: Asam asetat) dengan perbandingan (3:8:3). Fase diam yang digunakan adalah silika gel F254 [19].

Spot yang menunjukkan perubahan warna kuning cerah dengan latar ungu pada sinar tampak menunjukkan aktivitas antioksidan [16]. Hasil KLT uji aktivitas antioksidan setelah penyemprotan pereaksi DPPH 0,15 mM dapat dilihat di Gambar 1.

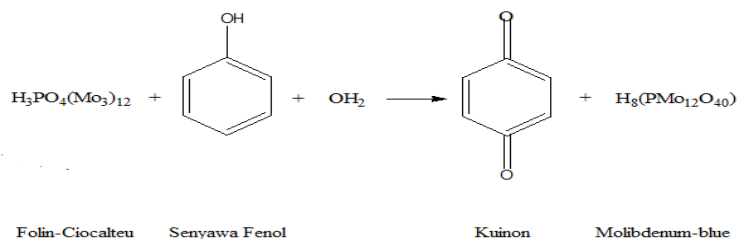


Gambar 1. Profil KLT Hasil Uji Antioksidan ekstrak etanol dengan pereaksi DPPH 0,15 mM, FD (Silika gel F 254) dan FG (Toluen: Butanol: Asam Asetat= 3:8:3). A.pada UV 254 Sebelum disemprot), (B pada. UV 254 Setelah disemprot)

Hasil uji aktivitas antioksidan dengan pereaksi semprot DPPH 0,15 mM pada visual menunjukkan bahwa hasil spot positif memiliki aktivitas antioksidan yang dilihat dari perubahan warna menjadi kuning cerah pada R_f sampel = 0,90 dan R_f standar = 0,925. Skrining antioksidan ekstrak etanol daun awar-awar mampu meredam radikal DPPH atau memiliki aktivitas antioksidan yaitu senyawa flavonoid.

3.3. Analisis kuantitatif kadar fenolik

Kadar senyawa fenolik menggunakan pereaksi *Folin Ciocalteau* (1:10). Pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik hidroksi mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) yang terdapat dalam pereaksi *Folin Ciocalteau* menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten. Reaksi berlangsung sempurna dalam suasana basa. Produk reaksi membentuk kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru. Warna biru yang terbentuk akan semakin pekat, setara dengan konsentrasi ion fenolat yang terbentuk [20]. Gambar 2 menyajikan reaksi dengan pereaksi Folin-Ciocalteau.



Gambar 2. Reaksi reagen *Folin Ciocalteau* dengan polifenol

Tabel 2. Kadar fenolik total ekstrak etanol 70% daun awar-awar

Replikasi	Bobot (mg)	Abs	X (µg/mL)	Vol (mL)	Fp	Kadar
						(% b/b EAG)
1	25,2	0,348	16,66	25	5	8,21
2	24,8	0,334	15,02	25	5	7,57
3	25,0	0,353	17,09	25	5	8,54
4	25,1	0,350	16,77	25	5	8,35
5	24,8	0,340	15,67	25	5	7,90
\bar{x} (Rata-rata)						8,11
SD (standart deviasi)						0,383
CV (Coevisien Variasi)						4,72%
LE (Limit of error)						0,364

Dari data pada Tabel 1, kadar fenolik total ekstrak etanol daun awar-awar yaitu $8,11 \pm 0,364$ % b/b Ekuivalen Asam Galat. Hasil statistik nilai CV kurang dari 5% sehingga homogenitas data memenuhi syarat karena kurang dari 5% [21].

3.4. Uji aktivitas antioksidan

Metode untuk antioksidan dengan DPPH. Parameter yang digunakan adalah nilai ES_{50} (*Effective scavenging*). Aktivitas penangkapan radikal bebas dan nilai ES_{50} oleh sampel dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol dengan Metode DPPH

Replikasi	ES_{50} (µg/mL) ekstrak etanol	ES_{50} Kuersetin (µg/mL)
1	22,10	4,49
2	21,53	4,47
3	20,33	4,51
4	21,14	4,49
5	20,93	4,68
6	21,11	4,59
Rerata ± LE	21,19 ±0,56	4,54±0,08
CV (%)	2,79	1,81

Menurut Molyneux (2004) sampel yang memiliki nilai $ES_{50} < 50 \mu\text{g/ml}$ memiliki tingkat kekuatan antioksidan kategori sangat kuat, $50-100 \mu\text{g/ml}$ antioksidan kuat, $100-150 \mu\text{g/ml}$ antioksidan sedang, $150-200 \mu\text{g/ml}$ antioksidan lemah dan $> 200 \mu\text{g/ml}$ antioksidan sangat lemah [22]. Berdasarkan Tabel 3, kuersetin memiliki ES_{50} sebesar $4,54 \mu\text{g/ml}$, sedangkan nilai ES_{50} ekstrak etanol daun awar-awar sebesar $21,19 \mu\text{g/mL}$, termasuk memiliki potensi antioksidan kategori sangat kuat.

4. KESIMPULAN

Kadar fenolik total ekstrak etanol 70% daun awar-awar sebesar 8,11% Ekuivalen Asam Galat. Nilai ES_{50} ekstrak etanol daun awar-awar adalah $21,19 \mu\text{g/mL}$, dan standar kuersetin adalah $4,542 \mu\text{g/mL}$, sehingga mempunyai aktivitas antioksidan sangat kuat.

Ucapan terimakasih: Penulis juga mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan atas fasilitas laboratorium Kimia Farmasi selama penelitian ini dilaksanakan.

Reference

1. Russo, Leopoldini MN and Toscano M. The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chemistry*. **2011**, 125: 288-306
2. Bawa AAP, Bogoriani NW and Diantariani NP. Ekstraksi Zat Warna Alam dari Bonggol Tanaman Pisang (*Musa paradisiaca*) dengan Metode Maserasi, Refluks dan Sokletasi. *Jurnal Kimia Universitas Udayana*. **2014**, 8(1): 113-119
3. Zhou C, Sun C, Chen K, and Li X. Flavonoids, Phenolics and Antioxidant Capacity in the Flower of *Eriobotrya japonica* Lind L. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**, 12(5): 2935-2945
4. Lansky EP, Paavilainen HM, Pawlus AD and Newman RA. *Ficus* spp : Ethnobotany and Potential as Anticancer and Anti-Inflammatory Agents. *Journal of Ethnopharmacology*. **2008**, 119: 195-213
5. Singh SBK and RP. Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. **2011**, 48(4): 412-422
6. Damu AGK, Ping-Chung S, Lian Shi L, Chia-Ying K, Chang-Seng W, Pei-Lin W and Tian Shung. Phenantroindolizidine: Alkaloids from the Stems of *Ficus septica*. *Journal of Natural Product*. **2005**, 68: 1071-1075
7. Yang JY, Walicki J, Michod D, Dubuis G and Widmann C. Impaired Akt Activity Down-Modulation, Caspase-3 Activation, and Apoptosis in Cells Expressing a Caspase-resistant Mutant of RasGAP at Position 157. *Molecular Biology of the Cell*. **2005**, 16(8): 3511-3520
8. Magalhaes LM, Segundo MA, Reis S, Lima and Jose LFC. Methodological Aspects about In Vitro Evaluation of Antioxidant Properties. *Analytica Chimica Acta*. **2008**, 613: 1-19
9. Choi EM, Ji H, Oh JY, Kim YM, Ha KS, Ha J, Kim JA, Han. COX-2 Regulates PD53 Activity and Inhibits DNA Damage-Induced Apoptosis. *Cancer Research*. **2005**, 328(4): 1107-1112
10. Taha MR, Muhammad A, Mohammad A, Madi A, Khalil E, Juan A, Bayan A, Ali A and Wade Y. Effect of Drying Process on Total Phenolics, Antioxidant Activity and Flavonoid Contents of Common Mediterranean Herbs. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. **2015**, 8(2): 145
11. Anonim. *Farmakope Herbal Indonesia (Edisi I)*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 2008

12. Dehpour AA, Ebrahimzadeh MA, Fazel NS and Mohammad NS. Antioxidant Activity of Methanol Extract of *Ferula assafoetida* and Its Essential Oil Composition. *Grasas Aceites*. **2009**, 60(4): 405-412
13. Salamah N and Farahana L. Antioxidant Activity Assay of Ethanolic Extract of *Centella asiatica* (L) Urb Herb using Phosphomolybdate Method. *Pharmaciana*. **2014**, 5(1): 24-25
14. Renee LB, Kubola J, Siriamompun S, Herald TJ and Shi YC. Wheat Bran Particles Size Influence on Phytochemical Extracibility and Antioxidant Properties. *Journal of Food Chemistry*. **2014**, 152: 483-490
15. Alfian R and Susanti H. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* Linn) dengan Variasi Tempat Tumbuh secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. **2012**, 2(1): 73-80
16. Faskalia and Muhammad AW. Skrining Fitokimia, Uji Aktivitas Antioksidan dan Uji Sitotoksik Ekstrak Metanol pada Akar dan Kulit Batang Soma (*Ploiarium alternifolium*). *JKK*. **2014**, 3(3): 1-6
17. Salamah N and Widayarsi E. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria longan* (L) Steud) dengan Metode Penangkapan Radikal 2-2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil. *Pharmaciana*. **2015**, 5(1): 25-34
18. Warsi and Guntarti A. Aktivitas Penangkapan Radikal 2-2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH) oleh Ekstrak Metanol Paprika Merah (*Capsicum annuum* L). *Media Farmasi*. **2016**, 13(1): 23-34
19. Cheng SH, Khoo HE, Ismail A, Abdul-Hamid A and Barakatun-Nisak MY. Influence of Extraction Solvents on *Cosmos caudatus* Leaf Antioxidant Properties. *Iranian Journal of Science and Technology*. **2016**, 40: 51-58
20. Apsari PD and Susanti H. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L) dengan Variasi Tempat Tumbuh secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. **2011**, 2(1): 73-80
21. Bunawan H, Syarul NB and Siti NB. *Cosmos caudatus* Kunth: A Traditional Medicinal Herb. *Global Journal of Pharmacology*. **2014**, 8(3): 420-426
22. Molynuex P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal Science of Technology*. **2004**, 26(2): 211-219



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).