

Pengaruh Purifikasi Terhadap Kandungan Zat Aktif Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 50% Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.)

The Effect Of Purification On The Content Of Active Substances And Antioxidant Activity From 50% Ethanol Extract Of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaves

Diyan Sakti Purwanto¹, Hari Susanti², Nining Sugihartini³

¹ Mahasiswa Pasca Sarjan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

² Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

³ Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan

e-mail: diyansaktipurwanto@gmail.com

(tanggal diterima: 02-09-2021, tanggal disetujui: 04-10-2021)

INTISARI

Purifikasi ekstrak etanol 50% daun kelor (*Moringa oleifera* L.) dilakukan untuk meningkatkan kandungan zat aktif flavanoid, β -karoten, saponin dan tanin yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan dapat meningkatkan kandungan zat aktif serta memperoleh warna ekstrak yang lebih menarik. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui jenis pelarut yang paling optimal antara etil asetat dan n-heksana dalam fraksinasi ekstrak etanol 50% daun kelor.

Purifikasi menggunakan metode fraksinasi dengan etil asetat dan n-heksana. Ekstrak dan fraksi dievaluasi parameter meliputi susut pengeringan ekstrak dengan Halogen Moisturer, organoleptis, kadar β -karoten dengan HPLC (High Performance Liquid Chromatography) dan aktivitas antioksidan dengan DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Dari data yang diperoleh dianalisis statistik one way ANOVA dengan taraf kepercayaan 95%.

Hasil Penelitian menunjukkan bahwa susut pengeringan ekstrak etanol 50% daun kelor adalah 4,16 dengan CV (coefficient of variation) 4,62%. Hasil purifikasi pada kadar β -karoten paling optimal pada fraksi n-heksana (E3) kemudian etil asetat (E2) dan etanol 50% (E1) yaitu $1.48 \pm 0.01\%$, $1.19 \pm 0.005\%$ dan $0.73 \pm 0.01\%$. Sedangkan aktivitas antioksidan (IC50) paling optimal pada fraksi n-heksana (E3) kemudian etanol 50% (E1) dan etil asetat (E2) yaitu 40.83 ± 0.04 ug/ml, 47.75 ± 0.09 ug/ml dan 58.79 ± 0.10 ug/ml. Sehingga hasil purifikasi menunjukkan nilai aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksana dan ekstrak etanol 50% termasuk dalam kategori sangat kuat sedangkan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori kuat sehingga berpotensi sebagai antioksidan.

Kata kunci : daun kelor (*Moringa oleifera* L.); purifikasi; β -karoten; antioksidan

ABSTRACT

Purification extract ethanol 50% of Moringa dry leaves was carried out to increase the active substance content of flavonoids, β -carotene, saponins and tannins which have antioxidant activity. So that purification extract ethanol 50% of Moringa dry leaves was carried out to increase the active substance content and to obtain a more attractive extract of color. The purpose of this study was to determine the optimal solvent between ethyl acetate and n-hexane in the ethanol extract fractionation of 50% Moringa leaves.

Fractionation was used ethyl acetate and n-hexane. The extract and fraction were evaluated for the parameters including the drying shrinkage of the extract with Halogen Moisturer, organoleptis, levels the β -carotene by HPLC (High Performance Liquid Chromatography) and the antioxidant activity with DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Data were analyzed statistically one way ANOVA with a confidence level of 95%.

The results of drying shrinkage the ethanol extract of 50% Moringa leaves is 4.16 with a CV (coefficient of variation) of 4.62%. The purification on β -carotene level on fractured with n-hexane



(E3) then ethyl acetate fraction (E2) and ethanol extract 50 % (E1) that is $1.48 \pm 0.01\%$, $1.19 \pm 0.005\%$ and $0.73 \pm 0.01\%$. While antioxidant activity (IC₅₀) were the most optimal in the n-hexane fraction (E3) then ethanol extract 50 % (E1) and ethyl acetate fraction (E2) that is 40.83 ± 0.04 ug/ml, 47.75 ± 0.09 ug/ml and 58.79 ± 0.10 ug/ml. The purification results ethanol extract of 50% Moringa leaves and n-hexane fraction were included in the very strong category while the ethyl acetate fraction was included in the strong category so that it has the potential to be an antioxidant.

Key words: Moringa oleifera L. leaf; purification; β -karoten; antioxidants

1. PENDAHULUAN

Purifikasi ekstrak etanol 50% daun kelor perlu dilakukan untuk meningkatkan kadar zat aktif dan nilai estetika ekstrak sehingga ketika diformulasikan dalam sediaan akan memberikan manfaat dan warna yang menarik. Hal ini berdasarkan penelitian [1] dan [2] yang menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak mempengaruhi sifat fisik sediaan dan diperoleh fakta bahwa warna sediaan masih terlalu pekat sehingga kurang menarik.

Penelitian sebelumnya juga telah menunjukkan bahwa purifikasi ekstrak mampu meningkatkan kadar dan aktifitas zat aktif. Penelitian [3] menunjukkan bahwa fraksinasi ekstrak petroleum eter daun kelor dengan n-heksana mampu meningkatkan kadar vitamin E. Demikian juga penelitian [4] menunjukkan bahwa fraksinasi ekstrak etanol 50% daun kelor dengan etil asetat memberikan warna ekstrak yang lebih menarik serta memiliki kadar total fenol dan flavonoid yang lebih tinggi dari pada fraksi n-heksana. Tujuan purifikasi tersebut adalah meningkatkan kandungan zat aktif dalam ekstrak yang tersari sehingga aktivitas akan meningkat serta warna ekstrak akan lebih cerah [5].

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa daun kelor memiliki aktivitas antioksidan, antiaging, tabir surya dan agen anti tirosinase namun setiap hasil menunjukkan nilai hambat yang berbeda tergantung pada jenis dan konsentrasi pelarut yang digunakan . Salah satu faktor yang mempengaruhi jumlah zat aktif adalah tahapan dan jenis pelarut dalam penyarian. Dalam penelitian ini akan dilakukan metode penyarian dengan menggunakan etanol 50% daun kelor yang dilanjutkan purifikasi dengan etil asetat dan n-heksana. Jenis pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak sesuai dengan konsep *like dissolve like* dimana senyawa polar dalam tanaman akan larut dalam pelarut polar, senyawa semipolar akan larut dalam pelarut semipolar dan senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Etil asetat merupakan pelarut semipolar sehingga dapat melarutkan senyawa semi polar, sedangkan n-heksana merupakan pelarut non polar sehingga β -karoten dapat lebih banyak tersari pada fraksi n-heksana yang bersifat non polar yang akan berpengaruh pada aktivitas antioksidan [6].

Dari hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa pelarut etanol konsentrasi 50% memiliki aktivitas paling baik sebagai tabir surya. Sehingga berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan penelitian tentang purifikasi ekstrak etanol 50% daun kelor dengan etil asetat serta n-heksana yang ditujukan untuk mengetahui kandungan zat aktif, β -karoten dan aktivitas antioksidan. Hasil uji akan



memberikan informasi pelarut yang optimal dalam fraksinasi ekstrak etanol daun kelor utamanya dalam menyari β -karoten yang mampu mengikat spesies oksigen reaktif (ROS) sebagai antioksidan [7].

2. METODE

2.1. ALAT DAN BAHAN

Tanaman yang digunakan adalah daun kelor (*Moringa oleifera* L.) kering yang diperoleh dari daerah Sleman sebanyak 1 kg dipanen pada bulan Februari 2019 serta telah dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sedangkan bahan kimia yang digunakan dalam penelitian adalah DPPH (*Aldrich*) p.a, β -karoten (*Sigma*) p.a, KH_2PO_4 (*Merck*) PA, NaOH (*Merck*) p.a, Asetonitril, methanol, diklorometana aquades, etanol teknis, etil asetat teknis, n-heksana teknis, aqua pro HPLC.

2.2. CARA KERJA

Determinasi Tumbuhan Kelor

Determinasi tumbuhan adalah proses dalam menentukan nama atau jenis tumbuhan secara spesifik agar dapat tepat sasaran dalam pemanfaatannya [8]. Determinasi kelor dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Penyiapan Ekstrak Daun Kelor

Penyarian serbuk daun kelor dengan metode maserasi pada perbandingan 1:40. Serbuk sampel yang telah ditimbang direndam dalam pelarut etanol 50% selama 72 jam pada suhu kamar dengan pengadukan setiap 24 jam. Setelah itu difiltrasi dengan kertas saring dan pompa vakum. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan menggunakan evaporator kemudian dikentalkan menggunakan waterbath pada suhu 50°C selama 48 jam. Ekstrak kering kemudian diambil dan ditempatkan dalam kemasan botol dan disimpan dalam *freezer* sebelum digunakan sebagai bahan analisis [9].

Purifikasi ekstrak

Ekstrak etanol 50% daun kelor yang diperoleh kemudian difraksinasi dengan menggunakan etil asetat dan n-heksana. Ekstrak etanol 50% kering dilarutkan dalam aquades pada suhu 70 °C kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah dan ditambah dengan etil asetat atau n-heksana [10]. Berdasarkan aktivitas tersebut maka akan diperoleh 3 jenis ekstrak yaitu ekstrak etanol 50% (E1), ekstrak etanol 50% (E1) terpurifikasi etil asetat (E2) dan ekstrak etanol 50% (E1) terpurifikasi n-heksana (E3). Masing-masing ekstrak akan ditetapkan kadar air, kadar β -karoten dan aktivitas antioksidan.

Susut Pengeringan Ekstrak

Penentuan susut pengeringan ekstrak etanol 50% alat Halogen Moisturer [11]. Satu gram ekstrak kental etanol 50% daun kelor ditimbang dalam wadah aluminium foil yang telah ditara kemudian dikeringkan pada suhu 105°C dalam waktu 15 menit hingga konstan dan ditimbang serta dilihat susut pengeringan ekstrak. Dilakukan pencatatan nilai susut pengeringan ekstrak



yang ditunjukkan oleh Halogen Moustureser. Pengukuran susut pengeringan ekstrak dilakukan tiga kali replikasi.

Uji Organoleptis

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin. Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap bentuk, rasa, warna dan bau.

Penetapan β -karoten

Penetapan kadar β -karoten dilakukan dengan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Sebelum penetapan kadar β -karoten dilakukan validasi metode analisis dengan parameter yang digunakan meliputi linieritas, presisi, akurasi, LOD & LOQ. Linieritas dengan cara membuat seri larutan baku β -karoten pada konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5 dan 6 $\mu\text{g/ml}$ sehingga dihasilkan luas area yang dicatat dan dibuat persamaan linier hubungan antara kadar dan luas area yang dihasilkan. Presisi dengan cara membuat larutan standar β -karoten dengan 3 variasi konsentrasi yaitu 2, 4 dan 6 $\mu\text{g/ml}$ dengan masing-masing 3 replikasi kemudian data waktu retensi dan luas area dicatat dan dihitung rata-rata, simpangan baku (SD) dan simpangan baku relatif (RSD). Akurasi dilakukan dengan adisi antara standar β -karoten dan sampel kemudian campuran dianalisis dan hasilnya dibandingkan terhadap kadar analit yang ditambahkan (kadar sebenarnya) dengan konsentrasi yang digunakan adalah 80%, 100% dan 120% dari kadar ekstrak yang didapat. LOD & LOQ diperoleh dengan cara menyuntikkan standar β -karoten pada konsentrasi 0,2 – 1 ppm hingga diperoleh persamaan kurva baku LOD & LOQ.

Penetapan kadar β -karoten menggunakan fase gerak *Asetonitril : metanol : diklorometana* (37 : 10 : 53 v/v/v) untuk pemisahan karotenoid. Sampel E1, E2, dan E3 sebanyak 40 μl disuntikkan kedalam sistem HPLC dengan kecepatan 1 ml/menit dan dibaca pada panjang gelombang 450 nm. Identitas puncak dan nilai λ max senyawa ini dibandingkan dengan waktu retensi dan karakteristik spektra kromatogram standard [12].

Aktivitas Antioksidan

Aktivitas antioksidan ditentukan dengan aktivitas penangkal radikal bebas DPPH [13]. Kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas DPPH dilihat dari berkurangnya intensitas warna ungu dari larutan DPPH setelah ditambahkan sampel. Pengujian dilakukan dengan metode DPPH dengan beberapa seri konsentrasi yaitu 10, 25, 50,75 dan 100 ppm. E1, E2, dan E3 diberi sebanyak 1 ml sampel ditambahkan dalam 1 ml DPPH 0,15 mM kemudian divorteks lalu disimpan dalam ruang tertutup (diinkubasi) pada suhu 37°C selama rentang waktu 20 – 60 menit dan divorteks kembali, selanjutnya diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Hasil pengukuran yang baik, larutan memberikan serapan sebesar 0,2 – 0,8 di daerah ultraviolet atau cahaya tampak. Aktivitasnya dibandingkan dengan β -karoten sebagai standar. Persentase penghambatan radikal bebas dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{Abs kontrol negatif} - \text{Abs Sampel}}{\text{Abs kontrol negatif}} \times 100\%$$



Nilai IC_{50} dihitung menggunakan persamaan regresi linier, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan persen penghambatan (% inhibisi) sebagai sumbu y. Dari persamaan $y=a+bx$ dapat dihitung nilai IC_{50} . IC_{50} β -karoten dan sampel ekstrak daun kelor masing - masing dihitung nilai standar deviasi (SD) dan koefisien variasi (CV).

Analisis Data

Pada penelitian ini data nilai β -karoten dan nilai IC_{50} dibandingkan dengan analisis statistik menggunakan *One Way ANOVA* untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna secara signifikan dengan taraf kepercayaan 95%.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Tumbuhan kelor

Determinasi tumbuhan kelor (*Moringa oleifera* L.) adalah proses dalam menentukan nama atau jenis tumbuhan secara spesifik agar dapat tepat sasaran dalam pemanfaatannya. Determinasi kelor dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang terdapat dalam surat keterangan hasil determinasi nomor 17.14.09/UN1/FFA/BF/PT/2020 tertanggal 14 September 2020. Hasil determinasi tumbuhan menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan dalam penelitian adalah spesies kelor *Moringa oleifera* L. suku *Moringaceae*.

Susut Pengerinan Ekstrak

Pengukuran susut pengerinan ekstrak etanol 50% daun kelor dengan menggunakan alat Halogen Moisturer. Penetapan susut pengerinan merupakan salah satu persyaratan yang harus dipenuhi dalam standardisasi tumbuhan yang berkhasiat obat dengan tujuan dapat memberikan batas maksimal (rentang) tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengerinan [14]. Pada uji susut pengerinan ini dilakukan pengukuran sisa zat setelah pengerinan pada suhu $105^{\circ}C$ dimana air akan menguap dan senyawa yang mempunyai titik didih yang lebih rendah dari air akan ikut menguap (Depkes RI 2000). Rerata susut pengerinan ekstrak etanol 50% daun kelor adalah 4,16% dengan CV 4,62%. Untuk parameter susut pengerinan tidak ada syarat atau rentang nilai yang diperbolehkan tetapi pengukuran susut pengerinan ekstrak etanol 50% daun kelor perlu diketahui karena sebagai bahan utama sebelum dilakukan purifikasi dengan etil asetat dan n-heksana agar dapat memberikan kualitas dan stabilitas suatu ekstrak.

Uji organoleptik

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana seobjektif mungkin dengan pancaindra. Hasil organoleptik pada ekstrak etanol 50% (E1), Fraksi etil asetat (E2) dan fraksi n- heksana (E3) yang disajikan pada tabel 1 dapat diketahui bahwa dengan melakukan fraksinasi akan mempengaruhi sifat organoleptis dari ekstrak daun kelor. Pada fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana terlihat warna yang hijau kuning cerah sehingga akan lebih disukai di dunia industri. Dengan organoleptis dapat di gunakan sebagai evaluasi penggunaan bahan, formulasi dan penggunaan peralatan baru.



Tabel 1. Organoleptis Ekstrak Etanol 50% Daun Kelor yang Terpurifikasi

Uji	Ekstrak Etanol 50% (E1)	Fraksi Etil Asetat (E2)	Fraksi N-Heksana (E3)
Bentuk	Ekstrak kental	Ekstrak kental	Ekstrak Kental
Warna	Kuning kecoklatan	Hijau Kekuningan cerah	Kuning ke arah putih jernih
Bau	Khas	Khas	Khas
Rasa	Pahit	Pahit	Pahit
Gambar			

Penetapan β -karoten

Penetapan kadar β -karoten pada ekstrak etanol 50% daun kelor menggunakan HPLC [15] pada kondisi seperti yang disajikan pada Tabel 2. HPLC lebih efektif apabila dibandingkan dengan spektrofotometer karena memiliki sensitivitas dan akurasi yang tinggi serta analisis dapat langsung dimonitor komputer dan rekorder. HPLC didasarkan waktu retensinya dalam suatu pelarut [16].

Tabel 2. Kondisi operasi analisis β -karoten dengan HPLC

Kriteria	Kondisi
HPLC yang digunakan	shimadzu prominence LC-2030
Fase gerak	Asetonitril : Metanol : Diklorometana (37 : 10 : 53 v/v/v)
Fase diam	kolom Shimadzu C-18 dengan panjang 25 cm
Detector	UV-Visible λ maks 450nm
Flow rate	1 ml/menit pada suhu normal

Validasi metode analisis bertujuan untuk membuktikan bahwa metode penetapan kadar yang digunakan dapat memberikan hasil yang tepat dan teliti. Parameter yang digunakan meliputi uji kesesuaian sistem, presisi, akurasi, LOD & LOQ dan linieritas [17]. Metode analisis tersebut telah memenuhi persyaratan sehingga dapat digunakan untuk penetapan kadar β -karoten. Validasi metode analisis disajikan pada Tabel 3 dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 3. Hasil validasi metode analisa β -karoten

Parameter	Hasil Uji
Presisi	Kadar β -karoten (ppm) 2,136; 4,272 dan 6,408 adalah 1,92; 4,36 dan 6,26 dengan CV (%) 0,83; 0,38 dan 0,12
Akurasi	97,59%, 99,27% dan 101,95% pada kadar 12,4 ug, 15,5 ug dan 18,6 ug
Batas Deteksi (LoD)	0,16 ppm
Batas Kuantifikasi (LoQ)	0,54 ppm
Linearitas (R2)	0,9933

Presisi adalah kemampuan metode analisis yang menghasilkan pengukuran tetap pada setiap waktu dari sampel yang sama. Dari tabel 3 diketahui bahwa nilai $CV < 2\%$ sehingga memenuhi persyaratan presisi dimana nilai CV yang diperbolehkan berdasarkan 100% analit adalah $\leq 2\%$. Akurasi diekspresikan dengan nilai perolehan kembali yang umum untuk senyawa obat mayor dalam suatu campuran adalah kurang lebih 98-102% dan telah sesuai syarat persentase perolehan kembali (recovery) yang sesuai dengan level konsentrasi. Batas deteksi (LOD) adalah jumlah terkecil analit dalam sampel yang dapat dideteksi yang masih memberikan respon signifikan dibandingkan dengan blangko. Batas kuantitasi (LOQ) merupakan parameter pada analisis reknik dan diartikan sebagai kuantitas terkecil analit dalam sampel yang masih dapat memenuhi kriteria akurasi dan presisi, dari tabel II diketahui bahwa dalam penentuan kadar β -karoten harus diatas LOD yaitu 0,16 dan di atas LOQ yaitu 0,54. Linieritas menunjukkan hubungan matematik antara konsentrasi analit dalam sampel pada rentang tertentu dengan luas area puncak dan dari hasil uji menunjukkan persamaan kurva baku linier karena memiliki nilai r 0,9933 dimana nilai r lebih besar dari r tabel yaitu 0,959 sehingga dapat digunakan dalam menghitung kadar β -karoten dengan HPLC.

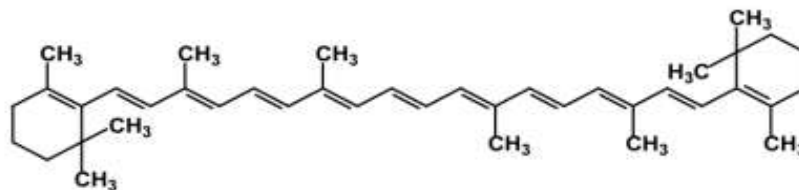
Kadar β -karoten diperoleh dengan cara menyuntikkan sampel ekstrak etanol 50%, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana dengan melarutkan pada fase gerak. Luas area yang diperoleh dibuat persamaan regresi kurva baku standar β -karoten sehingga diperoleh kadar β -karoten yang disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil kadar β -karoten ekstrak Etanol 50% daun kelor

Sampel	Kadar β -karoten ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	CV (%)
Ekstrak Etanol 50%	$0,73 \pm 0,01^*$	1,30
Fraksi Etil Asetat	$1,19 \pm 0,05^*$	4,24
Fraksi N-Heksana	$1,48 \pm 0,01^*$	0,64

Diketahui bahwa fraksi n-heksana (E3) memiliki kadar β -karoten paling tinggi $1,48 \pm 0,01$, kemudian fraksi etil asetat (E2) sebesar $1,19 \pm 0,05$ dan ekstrak etanol 50% (E1) sebesar $0,73 \pm 0,01$. Hal ini disebabkan oleh senyawa β -karoten yang bersifat non polar akan sangat larut baik dalam pelarut non polar [18] yaitu fraksi n-heksana sehingga kadar β -karotennya lebih banyak tertarik pada pelarut fraksi n-heksana. Hal ini berkaitan dengan teori like dissolve like, yaitu pelarut polar akan melarutkan solut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan solut non polar [19]. Pada penelitian yang lain disampaikan bahwa kadar β -karoten pada setiap ekstrak etanol 50%, 70%, 96% memiliki β -karoten $0,24 \pm 0,01$; $0,40 \pm 0,00$; $5,33 \pm 0,15$; $\mu\text{g/ml}$ [20]. Ada perbedaan kadar dimungkinkan karena adanya proses dalam pengukuran kadar. β -karoten adalah salah satu senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena β -karoten memiliki kemampuan dalam meredam radikal bebas terutama radikal singlet oksigen [21]. β -karoten memiliki sifat larut dalam minyak, kloroform, benzena, karbon disulfida, aseton dan petroleum eter tetapi tidak larut dalam air, etanol dan metanol [22]. Rumus struktur kimia β -karoten disajikan pada gambar 1.



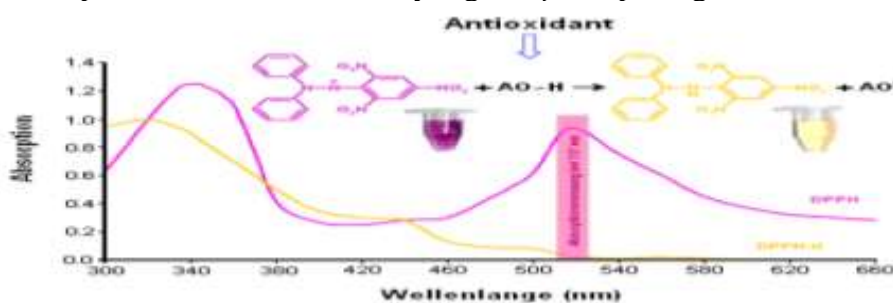


Gambar 1. Struktur kimia β -karoten [23]

Hasil analisis statistik pada post hoc test menunjukkan bahwa fraksi n-heksana memiliki perbedaan yang signifikan dengan fraksi etil asetat dan ekstrak etanol 50%. Dengan demikian proses purifikasi efektif dalam proses pemurnian dan penetapan kadar β -karoten.

Antioksidan

Pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH bertujuan mengukur kemampuan suatu senyawa sampel dalam menangkap radikal bebas DPPH. Prinsip metode DPPH berdasarkan penangkapan hidrogen dari senyawa antioksidan oleh DPPH menjadi DPP hidrazin (non radikal) dengan berubahnya warna ungu menjadi warna kuning. Perubahan warna tersebut yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Reaksi Antioksidan dengan DPPH [24].

Persen penangkapan radikal bebas digunakan untuk membandingkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH β -karoten dengan sampel sedangkan IC_{50} merupakan konsentrasi efektif senyawa uji yang menghasilkan aktivitas penangkapan radikal bebas DPPH sebesar 50%. Berdasarkan hasil pengukuran didapatkan bahwa panjang gelombang maksimum DPPH pada panjang gelombang 517 nm. Data serapan maksimum DPPH digunakan sebagai serapan kontrol negatif. Nilai IC_{50} Antioksidan disajikan pada tabel 5.

Tabel 5. Nilai IC_{50} Antioksidan Ekstrak Etanol 50% Daun Kelor

Sampel	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD	CV (%)	Penggolongan
Standar β -karoten	84,90 \pm 0,358*	0,421	Kuat
Ekstrak Etanol 50%	47,75 \pm 0,09*	0,18	Sangat kuat
Fraksi Etil Asetat	58,79 \pm 0,10*	0,18	kuat
Fraksi N Heksana	40,83 \pm 0,04*	0,11	Sangat kuat

Suatu senyawa dinilai sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100- 150) dan lemah (151-200). Semakin kecil nilai



IC₅₀ semakin tinggi aktivitas antioksidan. Dari tabel 5 diketahui bahwa nilai IC₅₀ fraksi n-heksana (E3) dan ekstrak etanol 50% (E1) secara berturut-turut adalah 40,83 ± 0,04 μg/ml; 47,75 ± 0,09 μg/ml dan termasuk dalam kategori sangat kuat sedangkan fraksi etil asetat (E2) adalah 58,79 ± 0,10 μg/ml dan termasuk dalam kategori kuat sehingga berpotensi sebagai antioksidan. Salah satu senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan adalah β-karoten. Kemampuan larutan ekstrak dalam menangkap radikal bebas DPPH dilihat dari berkurangnya intensitas warna ungu dari larutan DPPH setelah ditambahkan sampel. Pengurangan intensitas warna tersebut disebabkan oleh bereaksinya molekul radikal DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) dengan satu atom hidrogen yang dilepaskan oleh sampel, sehingga terbentuk senyawa DPPH tereduksi yaitu 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil yang berwarna kuning stabil [25]. Perbedaan aktivitas antioksidan secara teoritis dipengaruhi oleh kadar β-karoten yang memiliki kontribusi terhadap aktivitas antioksidan sehingga semakin tinggi kadarnya semakin baik pula aktivitas antioksidannya [26]. Aktivitas antioksidan juga dapat dipengaruhi oleh adanya senyawa fitokimia yang lain seperti asam askorbat, tokoferol dan pigmen seperti β-karoten yang memberikan efek sinergis[27].

Nilai IC₅₀ dihasilkan dari persamaan regresi linear hubungan antara konsentrasi ekstrak uji dengan persen penangkapan radikal bebas[28]. Terdapat hubungan korelasi antara aktivitas antioksidan dengan kadar β-karoten. Korelasi antara kadar β-karoten dengan antioksidan pada masing-masing ekstrak diketahui bahwa nilai IC₅₀ fraksi n-heksana (E3) yaitu 40,83 ± 0,04 μg/ml dipengaruhi oleh kadar β-karoten fraksi n-heksana (E3) yaitu 1,48±0,01 %. Hal ini dikarenakan β-karoten memberikan efek sinergis terhadap nilai IC₅₀. Dimana semakin tinggi nilai β-karoten pada fraksi n-heksana dapat lebih menurunkan nilai IC₅₀.

Hasil analisis statistik pada *post hoc test* menunjukkan bahwa fraksi n-heksana memiliki perbedaan yang signifikan dengan ekstrak etanol 50% dan etil asetat. Dengan demikian polaritas dari pelarut n-heksana berpengaruh terhadap penetapan aktivitas antioksidan.

4. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji yang telah dilakukan pada ekstrak etanol 50% daun kelor (E1), purifikasi dengan etil asetat (E2) dan purifikasi dengan n-heksana (E3) maka dapat diambil kesimpulan bahwa Purifikasi ekstrak etanol 50% daun kelor dengan n-heksana (E3) lebih dapat melarutkan β-karoten daripada etil asetat (E2) dan ekstrak etanol 50% (E1) secara signifikan serta menurunkan nilai IC₅₀ antioksidan.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Fakultas Farmasi Ahmad Dahlan Yogyakarta atas dukungan dan bantuan dalam pelaksanaan penelitian serta publikasi.

6. DAFTAR PUSTAKA



- [1] A. G. Latif, Auliah Rahmi, Nining Sugihartini. 2020. Physical Properties Of A/M Type Cream With Concentration Variation Of Moringa Leaves Ethanol Extract (*Moringa oleifera*) Using Tween 80 And Span 80 Emulgators. *Jurnal Media Farmasi*. vol. XVI, no. 1, pp. 9–17. doi: DOI: <https://doi.org/10.32382/mf.v16i1.1408>.
- [2] R. Rikadyanti, N. Sugihartini, and S. Yuliani. 2020. Sifat Fisik Krim Tipe M/A Ekstrak Etanol Daun Kelor [*Moringa oleifera* L.] dengan Variasi Konsentrasi Menggunakan Emulgator Asam Stearat dan Trietanolamin. *Jurnal Media Farasi*. vol. 16, no. 1, p. 88. doi: 10.32382/mf.v16i1.1423.
- [3] T. Wuryandari, N. Sugihartini, and K. Kintoko. 2019. Emulgel Formulation of Purified Extract of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaf. *Folia Medica Indonesia*. vol. 55, no. 1, p. 17. doi: 10.20473/fmi.v55i1.12545.
- [4] B. Herdi, Sugihartini N., Susanti H. 2020. Pengaruh purifikasi terhadap Profil Organoleptis, Rendemen, Total Fenol dan Total Flavonoid dari Ekstrak Etanol 96 % daun kelor (*Moringa oleifera* L.). Purification effect on Organoleptic Profile, Yield, Total Phenol and Total Flavonoids from 96 % E. *Jurnal Farmasi Indonesia*. vol. 17, no. 2, pp. 1–10. <https://doi.org/10.31001/jfi.v17i2.983>.
- [5] W. S. Putri, N. K. , Warditiani, and L. P. F. , Larasanty. 2012. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Thesis*. Jurusan Farmasi Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Udayana.
- [6] W. B. Leksono, R. Pramesti, G. W. Santosa, and W. A. Setyati. 2018. Jenis Pelarut Metanol Dan N-Heksana Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Rumput Laut *Gelidium* sp. Dari Pantai Drini Gunungkidul – Yogyakarta. *J. Kelautan Tropis*, vol. 21, no. 1, p. 9. doi: 10.14710/jkt.v21i1.2236.
- [7] A. Aprilia and E. Kurniawati. 2016. Pengaruh Beta Karoten pada Kulit Pisang Kepok dalam Mencegah Infark Miokard Akut The Influence Effect of Beta Carotene on The Banana Peel in Preventing Acute Myocardial Infarction. *MAJORITY*, vol. 5, no. 4, pp. 2–6, 2016.
- [8] Fika Rofiuddin Izza. 2018. *Pengembangan Kunci Determinasi Tumbuhan Hasil Eksplorasi Hutan Wisata Guci Kabupaten Tegal Untuk Sekolah Menengah Atas*, vol. 7, no. 2.
- [9] P. Husni, A. N. Pratiwi, and A. Baitariza. 2019. Formulasi Krim Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk). *Jurnal Ilmu Farmasi. Farmasyifa*. vol. 2, no. 2, pp. 101–110. doi: 10.29313/jiff.v2i2.4796.
- [10] S. Anwar, E. Yulianti, A. Hakim, A. G. Fasya, B. Fauziah, and R. Muti'ah. 2014. Uji Toksisitas Ekstrak Akuades (Suhu Kamar) Dan Akuades Panas (70 °C) Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Alchemy*. vol. 3, pp. 84–92. doi: 10.18860/al.v0i0.2900.
- [11] N. Safitri. 2013. Penentuan Kadar Air Pada Jamu Serbuk Di Surakarta Secara Metode Gravimetri. *Skripsi*. Fakultas Ilmu Kesehatan. Universitas Setia Budi.
- [12] A. Siswanto, A. Fudholi, A. K. Nugroho, and S. Martono. 2016. Validasi Metode HPLC Untuk Penetapan Aspirin Dan Asam Salisilat Dalam Plasma Kelinci (



- Lepus curpaeums*) secara Simultan Validation of A High Performance Liquid Chromatography Method for The Simultaneous Determination of Aspirin and Salicylic Acid In Rabb. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*. vol. 6, pp. 68–78. doi: p-ISSN: 2085-675X.
- [13] N. Rahman, P. Bahriul, and A. Diah. 2014. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) Dengan Menggunakan 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil. *J. Akad. Kim.*, vol. 3, no. 3, pp. 143–149. <https://dx.doi.org/10.22487/j24775185.2017.v6.i2.9238>
- [14] Y. P. Utami, A. H. Umar, R. Syahrani, and I. Kadullah. 2017. Standardisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae* Teijsm. & Binn.). *J. Pharm. Med. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 32–39.
- [15] S. Mangunsong, R. Assiddiqy, E. P. Sari, P. N. Marpaung, and R. A. Sari. 2019. Penentuan Beta Karoten Dalam Buah Wortel (*Daucus carota*) Secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (U-HPLC)(Determine of β -Caroten in carrot (*Daucus carota*) using Ultra High Performance Liquid Chromatograph (U-HPLC)). *Jurnal Action: Aceh Nutrition Journal*, (4)1: 36-4. <http://dx.doi.org/10.30867/action.v4i1.151>.
- [16] C. M. Erawati. 2006. Kendali Stabilitas Beta Karoten Selama Proses Produksi Tepung Ubi Jalar (*Ipomoea batatas* L.). Tesis. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- [17] B. Nugraheni and B. Anggoro. 2017. Validasi Metode Analisis dan Penurunan Kadar Infus Ciprofloksasin yang Dipengaruhi Reaksi Oksidasi Menggunakan HPLC," *J. Ilm. Manuntung*, vol. 2, no. 2, pp. 218–223. http://jurnal.akfarsam.ac.id/index.php/jim_akfarsam/article/view/69/67.
- [18] A. Purwanti, M. Egenia, and N. Alviyati. 2019. Optimasi Ekstraksi β -Karoten Ubi Jalar Kuning (*Ipomoea Batatas* .L) sebagai Sumber Potensial Pigmen Alami," *Pros. Nas. Rekayasa Teknol. Ind. dan Inf. XIV*, pp. 414–419
- [19] Yulianti, A. Laga, and M. Meta. 2012. Ekstraksi Beta Karoten Dari Wortel Dengan Pelarut Heksana Dan Petroleum Eter (Extraction of Beta Carotenes from Carrots with Hexane and Petroleum Ether Solvent)," *J. Ilmu. Bertani*, vol. 66, pp. 37–39. <https://doi.org/10.18343/jipi.26.2>
- [20] N. Sugihartini, D. E. Mugita Sari, M. S. Bachri, and S. Yuliani. 2019. The Amount of β Carotene, Total Phenolic and Total Flavonoid of Ethanol Extract of Leaf *Moringa oleifera* with Variation Concentration of Solvent," *Adv. Heal. Sci. Res.*, vol. 18, no. ADICS-PHS 2019, pp. 110–114, doi: 10.2991/adics-phis-19.2019.22.
- [21] I. Oka Adi Parwata, K. Ratnayani, and A. Listya. 2010. Aktivitas Antiradikal Bebas Serta Kadar Beta Karoten Pada Madu Randu (*Ceiba Pentandra*) Dan Madu Kelengkeng (*Nephelium longata* L.)," *J. Chem.*, vol. 4, no. 1, pp. 54–62.
- [22] Nurhasanah Idris. 2011. Penentuan Aktivitas Antioksidan Dari Buah Melon (*Cucumis Melo* Linn.) Secara Spektrofotometri Uv-Vis. *Skripsi*. Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- [23] T. Octaviani, A. Guntarti, and H. Susanti. 2014. Penetapan Kadar β -Karoten Pada Beberapa Jenis Cabe (*Genus Capsicum*) Dengan Metode



- Spektrofotometri Tampak. *Jurnal Pharmacia*, vol. 4, no. 2, pp. 101–109, doi: 10.12928/pharmacia.v4i2.1566.
- [24] D. P. D. Jackie Kang Sing Lung. 2018. Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH. *Jurnal Farmaka*, vol. 15, no. 1, pp. 53–62.
- [25] A. K. Hari Susanti, T. Wuryandari, N. Sugihartini, and K. Kintoko. 2019. Emulgel Formulation of Purified Extract of Moringa (*Moringa oleifera* L.) Leaf. *Folia Medica Indonesia*. vol. 55, no. 1, p. 17. doi: 10.20473/fmi.v55i1.12545.
- [26] Klaokwan Srisook. 2012. Antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Pluchea indica* Less. herbal tea," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 23, pp. 4077–4081. doi: 10.5897/jmpr12.773.
- [27] Reslely Harjanti and Anita Nilawati. 2020. Aktivitas Antioksidan dan Potensi Tabir Surya Serum Ekstrak Terpurifikasi Daun Wangon (*Oxalis psittacorum* (Willd.) Vahl.). *Jurnal Farmasi Indonesia.*, Vol. 17 No. 1. DOI : <https://doi.org/10.31001/jfi.v17i1.779>.
- [28] Vivin Nopiyanti and Reslely Harjanti. 2016. Analisis Stabilitas Senyawa Aktif Antioksidan Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Pada Penggunaannya Sebagai Bahan Tambahan Pangan Alami. *Jurnal Farmasi Indonesia*. Vol. 13 No. 2. DOI: <https://doi.org/10.31001/jfi.v13i2.197>.

