

## **Aktivitas Antioksidan Herba Kate Mas (*Euphorbia heterophylla* L.) terhadap Radikal DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)**

### **Antioxidant Activity of Kate Mas (*Euphorbia heterophylla* L.) Herb on DPPH Radical**

LOUIS MADALENA, TITIK SUNARNI\*, FRANSISKA LEVIANA

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi  
Jln. Letjen Sutoyo-Mojosongo Surakarta-57127 Telp. 0271-852518  
Email: titiksunarni@yahoo.co.id

(Diterima 18 September 2010, disetujui 20 Oktober 2010)

---

#### **Abstrak**

Antioksidan sangat penting dalam menjaga kesehatan tubuh manusia karena mampu meredam radikal bebas. Flavonoid merupakan antioksidan alami yang umum terdapat pada tumbuhan. *Euphorbia heterophylla* L. oleh masyarakat digunakan sebagai obat tradisional dengan nama daerah kate mas diketahui mengandung flavonoid, tanin dan saponin. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari ekstrak metanolik herba kate mas terhadap radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan parameter  $IC_{50}$ .

Herba kate mas diekstraksi secara maserasi menggunakan metanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian disuspensi dengan air selanjutnya difraksinasi dengan heksan dan etil asetat. Ekstrak herba kate mas beserta fraksi yang didapatkan diuji aktivitas antioksidannya terhadap radikal DPPH. Pengujian dilakukan dalam 4 seri konsentrasi dengan cara menambahkan 4,0 ml larutan uji dengan 1,0 ml DPPH 0,45 mM. Aktivitas terhadap radikal bebas diukur dengan alat spektrofotometer pada panjang gelombang 515 nm dan ditentukan harga  $IC_{50}$  dengan menggunakan analisis probit. Rutin digunakan sebagai kontrol positif.

Hasil menunjukkan bahwa herba kate mas memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak metanolik, fraksi air, fraksi heksan, dan fraksi etil asetat berturut-turut sebesar 44,43 ppm, 130,63 ppm, 212,81 ppm, dan 5,88 ppm, Fraksi etil asetat memiliki aktivitas paling kuat dibandingkan lainnya dengan nilai  $IC_{50}$  yang mendekati  $IC_{50}$  rutin yaitu 5,11 ppm sebagai kontrol positif.

**Kata kunci:** Antioksidan, *Euphorbia heterophylla* L., DPPH

---

#### **Abstract**

Antioxidant is very important to keep human's health because of it can scavenge free radical. Flavonoid is usual natural antioxidant got on plants. *Euphorbia heterophylla* L. which is used by people as traditional herbal medicine and it has traditional name kate mas is known contain of flavonoid, tannin and saponin. The aim of the experiment was to find out the antioxidant activity of kate mas (*Euphorbia heterophylla* L.) herb and the potency of methanolic extract, hexane, etil acetat and water fractions, and also of kate mas herb on DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radical with  $IC_{50}$  parameter.

Kate mas herb were extracted by maceration method using methanol. The obtained extract was partitioned with water and hexane, and then with etil acetat. The antioxidant activity of the obtained fraction was tested against DPPH radical. The test was conducted in 4 series of concentrations by adding 4.0 ml test solutions with 1.0 ml DPPH 0.45 mM. The radicals scavenging activity was measured with spectrophotometer at 515 nm wavelength and determined the  $IC_{50}$  value. The experiment used rutin as positive control.

The result of the experiment showed that kate mas herb had antioxidant activity with  $IC_{50}$  of methanolic extract, water fraction, *n*-hexane fraction, and etil acetat fraction: 44,43 ppm; 130,63 ppm; 212,81 ppm; and 5,88 ppm respectively. The etil acetat fraction has the strongest activity compairing to the other with the  $IC_{50}$  is almost near often rutin's  $IC_{50}$  is 5,11 ppm as the positif control.

**Keywords:** Antioxidant, *Euphorbia heterophylla* L., DPPH

## Pendahuluan

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul lain. Tubuh manusia tidak mempunyai cadangan antioksidan dalam jumlah berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka tubuh membutuhkan antioksidan eksogen (Sunarni 2005). Antioksidan sintetik seperti BHA, (butil hidroksi anisol), BHT (butil hidroksi toluen), PG (propil galat), dan TBHQ (tert-butil Hidrokuinon) dapat meningkatkan terjadinya karsinogenesis sehingga penggunaan antioksidan alami mengalami peningkatan (Rohman and Riyanto 2005). Senyawa-senyawa polifenol seperti flavonoid dan galat mampu menghambat reaksi oksidasi melalui mekanisme penangkapan radikal (radical scavenging) dengan cara menyumbangkan satu elektron pada elektron yang tidak berpasangan dalam radikal bebas sehingga banyaknya radikal bebas menjadi berkurang (Pokorny *et al* 2001).

Daun *Euphorbia heterophylla* L. dapat digunakan sebagai antitumor dan antikanker, dan baru-baru ini dinyatakan memiliki aktivitas anti HIV (Williams *et al* 1995). Daun kate mas (*Euphorbia heterophylla* L.) diketahui mengandung kuersetin (Falodun and Agbakwuru 2004). Kuersetin diindikasikan sebagai flavonoid yang mempunyai kemampuan antioksidan paling kuat (De Groot 1994).

Salah satu uji untuk menentukan aktivitas antioksidan penangkap radikal adalah metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 515 nm yang diikuti reaksi reduksi oleh senyawa antioksidan (Pokorny *et al* 2001). Penangkap radikal bebas menyebabkan elektron menjadi berpasangan yang menyebabkan penghilangan

warna yang sebanding dengan jumlah elektron yang diambil (Sunarni 2005).

Pada penelitian ini dilakukan uji antiradikal bebas DPPH untuk mengetahui potensi aktivitas antioksidan ekstrak metanolik, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air herba *Euphorbia heterophylla* L. dalam menghambat radikal bebas DPPH, yang bertujuan untuk mengetahui manakah dari seluruh zat uji yang memiliki potensi tinggi untuk dikembangkan sebagai bahan yang bersifat antioksidan, dan dapat bermanfaat untuk memberikan dasar ilmiah potensi herba *Euphorbia heterophylla* L. sebagai antioksidan dan memberikan acuan dalam usaha menemukan serta menyelidiki senyawa yang berkhasiat sebagai antioksidan dari tanaman yang tumbuh di Indonesia.

## Metode Penelitian

### Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah herba *Euphorbia heterophylla* L. yang ditanam di daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Bahan kimia yang digunakan meliputi *n*-heksan, etil asetat, dan metanol, metanol p.a. ((Merck, Germany), 1,1 difenil-2-pikrilhidrazil, rutin. Lempeng KLT selulosa, *n*-butanol, asam asetat glasial, asam klorida pekat, serbuk Mg, alkohol, amil alkohol, aquadest, besi (III) klorida 5%.

### Alat

Alat yang digunakan adalah panci maserasi, *vacuum rotaevaporator*, dan alat gelas. Alat kromatografi dan spektrofotometri adalah bejana kromatografi (*chamber*), lampu UV, pipa kapiler, oven, spektrofotometer UV-Vis, tabung *Sterling-Bidwell*, kondensor, labu destilasi, timbangan analisis, kuvet, labu takar. Alat lain yang

digunakan seperti *stopwatch*, timbangan miligram, *waterbath*, timbangan analitik, *beaker glass*, pipet volume, mikropipet, pipet ukur, siring.

### **Persiapan Bahan**

Tanaman sebelum digunakan harus dipastikan terlebih dahulu dengan dilakukan determinasi tanaman berdasar kunci determinasi menurut Backer and Van der Brink(1968).

Herba *Euphorbia heterophylla* L. yang telah ditetapkan identitasnya, dipilih yang tidak terlalu muda, tidak terlalu tua, masih segar dan dipetik siang hari. Herba selanjutnya dicuci dengan air, dikeringkan dengan oven pada suhu 50°C. Pembuatan serbuk menggunakan ayakan ukuran 40 mesh. Serbuk selanjutnya dilakukan penetapan kadar air dengan cara menimbang serbuk sebanyak 30 g kemudian dimasukkan dalam labu destilasi dan ditambahkan xylol sebanyak 150 ml atau sampai semua bahan terendam, lalu memasang alat destilasi *Sterling-Bidwell* beserta kondensor dan dipanaskan hingga sudah tidak ada air yang menetes pada tabung berskala pada tabung *Sterling-Bidwell*, dan didapatkan volume air pada skala yang ada sehingga diperoleh kadar air serbuk dalam satuan persen.

### **Pembuatan Ekstrak Metanolik Herba *Euphorbia heterophylla* L.**

Ekstrak metanolik dibuat dengan cara, 400 g serbuk herba *Euphorbia heterophylla* L. dimasukkan dalam panci lalu ditambah dengan metanol sebanyak 3000 ml. Maserasi dilakukan selama lima hari dengan penggojogan. Setelah itu dipisahkan antara filtrat dengan ampas. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *vacuum rotaevaporator* (suhu pada 40°C) selanjutnya disebut ekstrak metanolik herba *Euphorbia heterophylla* L.

### **Pembuatan Fraksi *n*-Heksan, Fraksi Etil Asetat, dan Fraksi Air**

Ekstrak metanolik yang diperoleh kemudian disuspensi dengan air sebanyak 75 ml lalu dipartisi dengan *n*-heksan 75 ml sebanyak tiga kali pada corong

pisah. Lapisan *n*-heksan selanjutnya dikumpulkan dan dipekatkan dengan *vacuum rotaevaporator*, sari *n*-heksan yang kering ini selanjutnya disebut fraksi *n*-heksan.

Lapisan berair sisa partisi dengan *n*-heksan kemudian dipartisi lagi dengan 75 ml etil asetat sebanyak tiga kali. Lapisan etil asetat dipisahkan dan dipekatkan dengan *vacuum rotaevaporator* dan diperoleh fraksi etil asetat. Lapisan air diuapkan di atas *waterbath* sampai kental, yang kemudian disebut fraksi air. Fraksi yang didapat masing-masing ditimbang untuk mendapat persen rendemen terhadap bobot awal.

### **Identifikasi Kandungan Flavonoid secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kandungan flavonoid fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air ekstrak metanolik herba *Euphorbia heterophylla* L. diidentifikasi secara KLT pada fase diam selulosa dan dielusikan dengan 2 fase gerak BAA yaitu *n*-butanol: asam asetat: air (BAA) dengan perbandingan 4:1:5 dan asam asetat 15%. Bercak yang terjadi diamati dengan lampu 366 nm. Untuk memperjelas warna bercak, diuapi dengan amonia dan disemprot dengan larutan sitroborat.

### **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH**

Sebanyak 1,0 ml larutan DPPH 0,45 mM ditambah 4,0 ml metanol, dikocok homogen dan diamati serapannya pada rentang  $\lambda$  500-523 nm dengan menggunakan blanko metanol. Sebelum dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum tersebut terlebih dahulu ditetapkan *operating time* untuk mengetahui kestabilan larutan DPPH.

### **Penetapan Aktivitas Antioksidan**

Penetapan aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak metanolik, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan fraksi air herba *Euphorbia heterophylla* L. beserta rutin sebagai kontrol positif dibuat menjadi 4 seri konsentrasi. Setiap konsentrasi larutan uji dipipet 4,0 ml dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan 1,0 ml larutan pereaksi DPPH 0,45 mM, dikocok homogen

dan didiamkan selama 30 menit kemudian diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang telah ditentukan. Percobaan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan kontrol negatif larutan DPPH 0,45 mM tanpa zat uji.

**Analisis Data**

Aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH dihitung dengan menggunakan rumus prosen peredaman sebagai berikut:

$$\text{Peredaman (\%)} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\%$$

Data selanjutnya dihitung dengan persamaan regresi linier berdasarkan rumus  $Y = a + bX$  dengan metode probit. Persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung  $IC_{50}$ .

**Hasil dan Pembahasan**

**Hasil Persiapan Bahan**

Hasil determinasi menurut pustaka Backer and Van der Brink (1968) adalah sebagai berikut:

1b\_2b\_3b\_4b\_12b\_13b\_14b\_17b\_18b\_19b\_20b\_21b\_22b\_23b\_24b\_25a \_\_\_\_\_ 99. **Euphorbiaceae**

1b\_3b\_4b\_6b\_57a\_58a \_\_\_\_\_ 59. **Euphorbia**

1b\_6a\_7a\_8a \_\_\_\_\_ **Euphorbia heterophylla L.**

Sebanyak 3400 gram herba kate mas basah dikeringkan pada suhu 40°C dan diperoleh 560 gram herba kering dengan rendemen 15,88%. Pengeringan dijaga pada suhu 40°C dalam oven, karena bila dilakukan di atas suhu 50°C dapat terjadi kerusakan pada simplisia. Hasil penetapan kadar air dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil penetapan kadar air herba kate mas**

No	Berat Simplisia (g)	Volume Air (ml)	Kadar Air (%)
1.	30,003	2,4	7,99
2.	30,002	2,5	8,33
3.	30,003	2,4	7,99
Rata-rata			8,10

Hasil penetapan kadar air serbuk herba *Euphorbia heterophylla* L. memenuhi persyaratan karena simplisia diharapkan prosentase kadar air berkisar 5-10% untuk mencegah pertumbuhan jamur pada saat penyimpanan dalam jangka waktu tertentu.

**Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi**

Ekstrak kental metanolik yang didapatkan dari 400 gram serbuk adalah 40,500 gram sehingga memiliki rendemen sebesar 10,13%. Ekstraksi dilakukan dengan metanol karena metanol merupakan pelarut universal sehingga dapat mengekstraksi hampir semua kandungan kimia dalam simplisia.

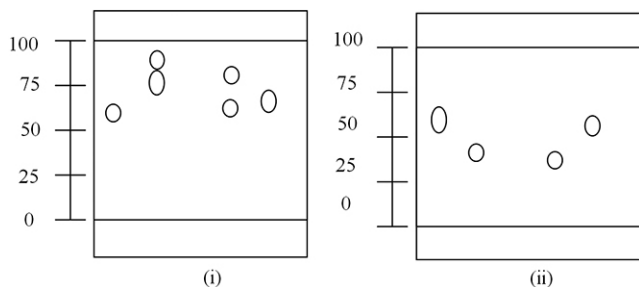
Ekstrak kental metanolik yang didapatkan kemudian dilakukan fraksinasi dengan *n*-heksan, etil asetat, dan air dimaksudkan untuk memisahkan senyawa berdasarkan polaritasnya, dimana fase *n*-heksan akan melarutkan kandungan senyawa tanaman yang bersifat nonpolar, fase etil asetat melarutkan senyawa yang bersifat semipolar, dan fase air melarutkan kandungan senyawa kimia tanaman yang bersifat polar. Hasil partisi dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Hasil fraksinasi ekstrak metanolik herba *Euphorbia heterophylla* L.**

Jenis Fraksi	Rendemen (%)			Rata-rata Rendemen (%)
	I	II	III	
<i>n</i> -heksan	62,14	61,09	57,19	60,14
Etil Asetat	7,89	6,39	8,11	7,46
Air	44,09	46,31	46,27	45,56

**Hasil Identifikasi Flavonoid secara KLT (Kromatografi Lapis Tipis)**

Hasil identifikasi flavonoid ekstrak metanolik, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air secara kromatografi lapis tipis terlihat seperti pada Gambar 1 dengan data KLT pada Tabel 3.



**Gambar 1.** Kromatogram KLT pada fase diam selulosa fase gerak (i) BAA (4:1:5) (ii) asam asetat 15% dari rutin (A), ekstrak metanolik (B), fraksi *n*-heksan (C), fraksi etil asetat (D), dan fraksi air (E) herba *Euphorbia heterophylla* L. dan disemprot sitroborat.

**Tabel 3.** Hasil KLT ekstrak dan fraksi herba kate mas pada fase diam selulosa dan fase gerak BAA (4:1:5) dan asam asetat 15%

Fase Gerak	Bahan Uji	Nama bercak	hRf	Warna Bercak		
				UV 366 nm	NH <sub>4</sub> OH	Sitroborat + 366 nm
BAA (n-butanol-asam asetat glasial- air (4:1:5))	Ekstrak	1	75	Kuning	Kuning	Kuning
	Ekstrak metanolik	2	91	Kuning	Kuning	Kuning
Asam asetat glasial- air (4:1:5))	Fraksi <i>n</i> -heksan	-	-	-	-	-
	Fraksi etil asetat	1	68	Kuning	Kuning	Kuning
Asam asetat 15%	Fraksi etil asetat	2	88	Kuning	Kuning	Kuning
	Fraksi Air	70	66	Kuning	Kuning	Kuning
Asam asetat 15%	Rutin	66	38	Kuning	Kuning	Kuning
	Ekstrak metanolik	-	-	-	-	-
	Fraksi <i>n</i> -heksan	-	-	-	-	-
	Fraksi etil asetat	35	50	Kuning	Kuning	Kuning
	Fraksi Air	50	56	Kuning	Kuning	Kuning
	Rutin	56		Kuning	Kuning	Kuning

Hasil KLT dengan 2 fase gerak yang berbeda polaritasnya menunjukkan profil kromatogram yang berbeda. Kromatogram KLT dengan fase gerak BAA dan asam asetat 15% menunjukkan adanya bercak yang mengarah flavonoid pada ekstrak metanolik, fraksi etil asetat dan air.

Nilai hRf bercak pada kromatogram fase diam BAA, menunjukkan salah satu bercak dari fraksi etil asetat dan air mendekati hRf dari bercak rutin. Hasil karakterisasi dengan pereaksi sitroborat, uap amonia, dan di bawah lampu UV 366 nm juga menunjukkan perubahan warna yang sama dengan rutin. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut kemungkinan fraksi etil asetat dan air mengandung rutin.

Ekstrak metanolik pada identifikasi KLT menunjukkan 2 bercak, hal ini karena pada ekstrak metanolik belum mengalami pemisahan kandungan senyawa.

Fase gerak yang digunakan untuk identifikasi adalah BAA dan asam asetat 15% karena fase tersebut termasuk fase gerak yang umum digunakan untuk identifikasi flavonoid. Flavonoid adalah senyawa polar dalam bentuk glikosidanya hingga semi polar dalam bentuk aglikonnya. Oleh karena itu fase diam yang digunakan dalam identifikasi ini adalah fase diam yang sesuai untuk senyawa polar yaitu selulosa

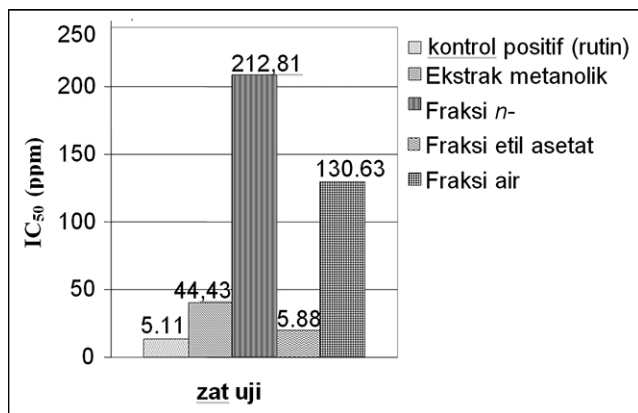
**Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan**

Panjang gelombang maksimum DPPH dalam metanol yang didapatkan pada penelitian ini adalah 515 nm. Pengukuran aktivitas peredaman radikal DPPH selanjutnya dilakukan pada panjang gelombang 515 nm. Perubahan warna violet larutan DPPH menjadi warna kuning karena bereaksi dengan antioksidan diikuti dengan penurunan serapan pada panjang gelombang 515 nm. Perubahan warna tersebut menunjukkan adanya aktivitas yang dapat dilihat dari prosentase peredamannya.

Rutin digunakan sebagai kontrol positif sebab telah terbukti aktivitas antioksidannya. IC<sub>50</sub> merupakan yakni daya konsentrasi larutan uji yang mampu meredam 50% larutan radikal bebas DPPH. Semakin kecil harga IC<sub>50</sub>, maka semakin efektif sebagai antioksidan. Harga IC<sub>50</sub> dapat dilihat pada Gambar 2 dan Tabel 4.

**Tabel 4.** Nilai IC<sub>50</sub> dari masing-masing zat uji

Replikasi	Harga IC <sub>50</sub> (ppm)				
	Rutin	Ekstrak metanolik	Fraksi etil asetat	Fraksi <i>n</i> -heksan	Fraksi air
1.	5,06	44,36	5,85	212,96	131,81
2.	5,18	44,55	5,84	210,87	129,12
3.	5,09	44,37	5,95	214,61	130,97
Rata-rata ± SD	5,11± 0,06	44,43± 0,11	5,88±0,06	212,81±1,87	130,63±1,38



Gambar 2. Aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas berdasar harga IC<sub>50</sub>.

Fraksi *n*-heksan memiliki nilai IC<sub>50</sub> tertinggi yaitu 212,81 ppm yang menunjukkan bahwa fraksi *n*-heksan memiliki aktivitas antioksidan paling lemah dibanding fraksi lainnya. Hal ini sesuai dengan identifikasi KLT dari fraksi heksan yang tidak menunjukkan bercak flavonoid, baik pada fase gerak BAA ataupun asam asetat 15%.

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan paling kuat dengan nilai IC<sub>50</sub> terendah yaitu 5,88 ppm bahkan lebih rendah daripada ekstrak metanolik yang belum terfraksinasi dengan nilai IC<sub>50</sub> 44,43 ppm. Aktivitas fraksi etil asetat yang lebih tinggi dari ekstrak metanolik menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari hasil penelitian ini bukan karena efek sinergis dari campuran senyawa tetapi karena adanya kemungkinan senyawa aktif antioksidan yang terkandung pada fraksi etil asetat. Selain itu, berdasarkan identifikasi KLT fraksi etil asetat menunjukkan bercak yang mengarah pada senyawa flavonoid dengan salah satu bercak terdeteksi mempunyai karakteristik seperti pada bercak rutin.

Aktivitas antioksidan pada fraksi air lebih lemah dari pada fraksi etil asetat dan bahkan juga lebih lemah dari ekstrak metanolik yaitu dengan nilai IC<sub>50</sub> 130,63 ppm. Hal ini kemungkinan karena fraksi air meskipun mengandung senyawa yang mengarah flavonoid pada identifikasi KLT tetapi senyawa tersebut memiliki aktivitas antioksidan yang lemah.

Berdasarkan hasil penelitian tersebut maka fraksi etil asetat mempunyai potensi yang tinggi untuk dikembangkan sebagai bahan yang bersifat antioksidan.

## Kesimpulan

Herba kate mas memiliki aktivitas antioksidan penangkap radikal DPPH.

Ekstrak metanolik, fraksi air, fraksi heksan, dan fraksi etil asetat secara berturut-turut memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 44,43 ppm; 130,63 ppm; 212,81 ppm; dan 5,88 ppm.

Fraksi etil asetat memiliki aktivitas paling kuat dibandingkan lainnya dengan nilai IC<sub>50</sub> mendekati IC<sub>50</sub> rutin yaitu 5,11 ppm sebagai kontrol positif.

## Daftar Pustaka

- Backer CA and Van der Brink RBC. 1968. *Flora of Java*. N.V.D. Noordhoff. Groningen.
- De Groot H. 1994. Reactive oxygen species in tissue injury. *J. Hepatogastroenterology*. 41:328-332.
- Pokorny J, Yanishlieva N, and Gordon M. 2001. *Antioxidant in Food: Practical Applications*. CRC Press. New York.
- Rohman A, Riyanto S. 2005. Daya antioksidan ekstrak etanol daun kemuning (*Murraya paniculata* (L) Jack) secara *In Vitro*. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 16(3):136 – 140.
- Sunarni T. 2005. Aktivitas antioksidan penangkap radikal bebas dari daun kepel (*Stelechocarpus burahol* (Bl). Hook f. & Th.). *Jurnal Farmasi Indonesia*, 2(1):12-15.
- Williams CA, Houlst, JRS, Harborne JB, Greenham J. 1995. A biologically active lipophilic flavonol from *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry* 38 (1): 267-270.