

**Pengaruh Jenis Cairan Penyari terhadap Aktivitas Antioksidan
Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Grey)
dengan Metode ABTS**

**Effects of Solvent on the Antioxidant Activity of Mexican Sunflower
(*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Grey) with ABTS Method**

Nursamsiar¹ *, Khairuddin², Jumarni¹, Marwati², Nurkhairi³

¹Departemen Kimia Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar
Jl. Perintis Kemerdekaan km 13,7, Makassar 90242, Indonesia.

²Departemen Biologi Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar
Jl. Perintis Kemerdekaan km 13,7, Makassar 90242, Indonesia

³Departemen Farmasetika, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar
Jl. Perintis Kemerdekaan km 13,7, Makassar 90242, Indonesia

*Corresponding author email: nur.samsiar@stifa.ac.id

Received 01-06-2021 **Accepted** 04-09-2021 **Available online** 31-12-2021

ABSTRAK

Radikal bebas berkontribusi pada beberapa gangguan pada manusia termasuk aterosklerosis, radang sendi, iskemia, gastritis, kanker dan inflamasi. Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Grey) merupakan spesies tumbuhan yang mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai antioksidan. Penelitian ini dilakukan untuk mengamati pengaruh jenis cairan penyari terhadap bioaktivitas kembang bulan sebagai antioksidan dalam meredam radikal 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS). Sampel dimaserasi menggunakan tiga cairan penyari yaitu etanol 70%, etil asetat, dan *n*-heksan. Sedangkan potensinya sebagai antioksidan diuji dengan metode ABTS. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol 70%, etil asetat dan *n*-heksan berturut-turut memberikan nilai IC₅₀ sebesar 56,71 µg/ml (kuat), 106,47 µg/ml (sedang) dan 191,57 µg/ml (lemah) dan vitamin C sebagai pembanding 10,46 µg/ml (sangat kuat). Semakin polar cairan penyari semakin kuat aktivitas antioksidan daun kembang bulan dalam meredam radikal ABTS.

Kata kunci: ABTS, antioksidan, flavonoid, kembang bulan

ABSTRACT

Free radicals contribute to various diseases in humans, including atherosclerosis, arthritis, ischemia, gastritis, cancer, and inflammatory. Mexican sunflower (*Tithonia*

diversifolia (Hemsl.) A.Gray) is potentially developed as an antioxidant. This study purposed to observe the effect of solvent on the antioxidant activity of Mexican sunflower leaves by the 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method. Leaves were extracted by maceration technique using three solvents, i.e., 70% ethanol, ethyl acetate, and n-hexane. The antioxidant activity was tested by the ABTS method using a UV-Vis spectrophotometer. The results showed that the IC_{50} of 70% ethanol, ethyl acetate, and n-hexane extracts was 56.71 $\mu\text{g/ml}$ (strong), 106.47 $\mu\text{g/ml}$ (moderate), and 191.57 $\mu\text{g/ml}$ (weak), respectively. Vitamin C showed a very strong antioxidant activity with an IC_{50} value of 10.46 $\mu\text{g/ml}$. Hence, the polarity of solvent affected the antioxidant activity, in which solvent with higher polarity exerted a more potent effect.

Keywords: ABTS, antioxidant, flavonoid, *Tithonia diversifolia*

Pendahuluan

Radikal bebas merupakan suatu spesies atau molekul yang mampu berdiri sendiri dalam suatu orbital atom dan memiliki elektron yang tidak berpasangan. Keberadaan elektron yang tidak berpasangan merupakan ciri khas dari sebagian besar radikal. Radikal yang terbentuk pada umumnya memiliki reaktivitas yang tinggi dan tidak stabil. Radikal dapat menjadi stabil oleh adanya donor elektron atau proton dari molekul lainnya seperti protein, lemak, karbohidrat maupun DNA, oleh karena itu radikal juga dapat berperan sebagai oksidan atau reduktor (Umayah & Amrun, 2007). Beberapa jenis radikal seperti radikal OH^* , hidrogen peroksida, oksigen singlet, radikal oksida nitrat, radikal anion superoksida, hipoklorit, dan radikal peroksinitrit merupakan kelompok radikal bebas yang mengandung oksigen dan menginisiasi banyak menyebabkan penyakit. Ini adalah spesies yang sangat reaktif, mampu didalam nucleus, dan dalam membrane sel untuk merusak molekul

yang relevan secara biologis menyebabkan sel-sel tersebut mengalami kerusakan dan kehilangan fungsi. Adanya paparan secara terus menerus akan menginisiasi munculnya berbagai penyakit dan penuaan dini (Liochev, 2013).

Secara alamiah tubuh mampu mencegah atau meminimalisir adanya paparan radikal bebas oleh adanya antioksidan alami yang cukup memadai. Antioksidan alami dalam tubuh atau yang disebut dengan istilah antioksidan endogen seperti piruvat dan lycopene glutathione dihasilkan dalam tubuh yang bertujuan mencegah pembentukan ROS. Namun jika paparan terjadi secara terus menerus maka antioksidan endogen tidak mampu mencegah sehingga perlu adanya tambahan antioksidan dari luar yang disebut sebagai antioksidan eksogen (Dayan & Kromidas, 2011). Antioksidan eksogen baik alami yang berasal dari bahan alam maupun sintetik merupakan pilihan untuk meminimalisir terjadinya paparan radikal yang berlebih (Isfahlan et al., 2010). Akan tetapi

penggunaan antioksidan sintetik memungkinkan dapat memberikan dampak lain yang tidak diharapkan oleh karena itu pencarian senyawa antioksidan yang berasal dari bahan alam masih sangat diperlukan (Saleh et al., 2010).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa beberapa organ dari tumbuhan seperti akar, batang, daun, buah, biji dan bagian lainnya terbukti mengandung senyawa berkhasiat antiradikal sehingga memiliki efek perlindungan terhadap paparan radikal dari luar (Selawa et al., 2013). Bagian dari tanaman tersebut mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berkhasiat dalam menangkal paparan radikal bebas seperti golongan senyawa fenolik maupun (Winarsi, 2007).

Kembang bulan atau insulin (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray) telah banyak digunakan secara empiris dalam berbagai pengobatan penyakit. Hal ini dikarenakan tanaman kembang bulan mengandung biomarker yang berperan dalam mencegah maupun mengobati berbagai jenis penyakit seperti malaria, diabetes dan lainnya. Beberapa informasi menyebutkan bahwa kandungan kimia utama yang terdapat pada bagian batang, daun, akar dan atau kulit barang diduga mengandung senyawa pofilenol, flavonoid, dan (Zirconia et al., 2015).

Beberapa aktivitas daun kembang bulan telah dilaporkan diantaranya ekstrak etanolik dari bagian daun terbukti dapat menyebabkan hipoglikemia pada tikus yang

diperlakukan terhadap aloksan. Senyawa flavonoid maupun alkaloid dari tanaman tersebut diduga mampu meningkatkan kinerja dari sel β -pankreas. Kandungan senyawa saponin mampu meningkatkan sensitivitas di jaringan adiposa (Pradiningsih et al., 2018). Bioaktivitas dari tanaman ini sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Porphyromonas gingivalis* telah dilaporkan (Mulyani, 2017) dan (Andini Koptaria et al., 2019). Dan peneliti lain melaporkan senyawa flavonoid yang diisolasi dari kembang bulan yaitu senyawa 5,7,8,3',4'-pentahidroksiflavonol (Zirconia et al., 2015). Eksperimen dari studi ini dilakukan untuk mengamati adanya pengaruh jenis cairan penyari terhadap bioaktivitasnya sebagai antioksidan metode 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS).

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Peralatan atau instrumen yang digunakan dalam penelitian ini yaitu oven simplisia (IL-80EN), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu®), rotary evaporator (Pilotvap®) timbangan analitik (Mettler Toledo®) dan alat-alat gelas.

Material yang digunakan pada penelitian ini yaitu air suling, almunium foil, daun kembang bulan, etil asetat, etanol p.a, etanol 70%, *n*-heksan, ABTS dan kertas saring.

Jalannya Penelitian

1. Pengolahan sampel

Sampel daun kembang bulan diperoleh dari kecamatan Tanete Riattang Barat Kabupaten Bone. Identifikasi terhadap spesies tanaman kembang bulan dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Sampel dicuci dengan air mengalir dan dilakukan sortasi. Sampel yang telah disortasi selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan cara dirajang. Sampel dihilangkan kadar airnya dengan pengeringan dalam oven simplisia selama 1 kali 24 jam pada suhu 50°C.

2. Pembuatan ekstrak daun kembang bulan

Simplisia diesktraksi menggunakan cairan penyari dengan kepolaran yang berbeda yaitu pelarut etanol 70%, etil asetat, dan *n*-heksan dengan teknik maserasi dengan perbandingan 1:10. Simplisia dimasukkan kedalam wadah dan direndam dengan masing-masing pelarut. Campuran ditempatkan pada suhu ruang dan ditempat gelap selama tiga kali 24 jam dan sewaktu-waktu dilakukan pengadukan. Setelah tiga kali 24 jam kemudian campuran difiltrasi untuk memisahkan residu dan filtrat. Selanjutnya residunya dimaserasi. Rendemen ekstrak dihitung dengan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

3. Penyiapan ABTS

Larutan stok ABTS (10ml) dengan konsentrasi 7,4 mM reaksi dengan larutan $K_2S_2O_8$ (10 ml) konsentrasi 2,45 mM dengan perbandingan 1:1 dan disimpan pada tempat gelap dan suhu kamar selama 1 kali 24 jam. Campuran dicukupkan volumenya hingga 50 ml dengan etanol p. (Shalaby & Shanab, 2013).

4. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS

Uji aktivitas antioksidan masing-masing sampel dan Vitamin C sebagai pembanding masing masing dibuat Larutan induk 1000 bpj. Vitamin C dilarutkan dalam aquadest. Dari larutan induk kemudian dibuat variasi konsentrasi untuk ekstrak etanol 70% (20, 40, 60, 80, 100 µg/ml), ekstrak etil asetat (40, 80, 120, 160, 200 µg/ml), *n*-heksan (100, 150, 200, 250, 300 µg/ml), dan vitamin C (3, 6, 9, 12 dan 15 µg/ml). Setiap konsentrasi dari larutan sampel dipipet 1 ml dan direaksikan dengan 1 ml ABTS dan ditambahkan pelarut etanol p.a hingga 5 ml, direplikasi sebanyak tiga kali kemudian diinkubasi selama 30 menit dan tentukan serapannya pada panjang gelombang 753 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Hasil dan Pembahasan

Kembang bulan merupakan tanaman yang telah banyak digunakan secara empiris untuk mengobati beberapa jenis penyakit. Determinasi sampel penelitian diperoleh data sampel

kembang bulan jenis *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A.Gray) dari suku Compositae/Asteraceae. Simplisia kering daun kembang bulan dibuat dalam empat tahap sortasi basah, pencucian, Perajangan dan pengeringan sampel. Sortasi basah dan pencucian merupakan tahapan awal yang ditujukan untuk menghilangkan kotoran dari sampel (Depkes RI, 2000). Tahapan perajangan untuk memperkecil ukuran sampel sehingga akan mempercepat proses pengeringan dan mempermudah komponen bioaktif yang terkandung sampel terlarut kedalam cairan penyari. Tahap pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven simplisia suhu 50°C dengan tujuan meminimalisir terjadinya kerusakan senyawa aktif dalam sampel (Fahmi et al., 2020).

Pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi secara maserasi untuk mencegah kerusakan senyawa yang terkandung dalam sampel karena pemanasan. penggunaan cairan penyari yang berbeda dengan tingkat kepolaran tertentu bertujuan untuk mengamati golongan senyawa yang kemungkinan memiliki profil senyawa yang berbeda sehingga dapat ditelusuri pengaruh senyawa metabolit sekunder dari masing-masing sampel terhadap bioaktivitasnya (Ames et al., 1993). Data persen rendemen dari sampel ekstrak yang disajikan pada Tabel 1. Rendemen terbanyak diperoleh dari ekstrak etanol, hal ini menunjukkan senyawa dalam sampel lebih larut dalam penyari polar dibandingkan semi polar dan nonpolar.

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS. Yang mana, metode ini memiliki kelebihan dapat digunakan pada sistem larutan berbasis air maupun organik, memiliki serapan khas pada rentang panjang gelombang lebih Panjang (daerah sinar tampak) dan reaksi yang diperlukan sangat minim (Lee et al., 2003). Senyawa radikal bebas ABTS merupakan senyawa yang diperoleh dari hasil oksidasi kalium persulfat dengan garam diammonium ABTS dalam pelarut etanol yang dapat dianalisis dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 753 nm (Dong et al., 2015) dan (Dawidowicz & Olszowy, 2013). Aktivitas antioksidan dari sampel ditandai dengan hilangnya warna biru pada pereaksi ABTS. Aktivitas antioksidan seperti pada Tabel 2.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antioksidan pada tabel 2 menunjukkan bahwa ketiga cairan penyari yang digunakan dapat menyari senyawa dari sampel dan memiliki aktivitas antioksidan. Ekstrak dari pelarut etanol memberikan hasil aktivitas antioksidan yang lebih kuat jika dibandingkan dengan ekstrak etil asetat dan *n*-heksan. Dengan urutan kekuatan aktivitas antioksidan secara berturut-turut yaitu ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan. Hal ini dipengaruhi oleh kandungan senyawa aktif yang terekstraksi pada masing-masing cairan penyari. Pada daun kembang bulan senyawa yang memberikan kontribusi terhadap aktivitas antioksidannya adalah senyawa polar yang lebih terlarut dalam penyari polar. Hasil penelitian

menunjukkan bahwa semakin polar cairan penyari maka kemampuan untuk mengekstraksi senyawa antioksidan lebih baik sehingga aktifitas antioksidan dengan metode ABTS semakin baik.

Bioaktivitas antioksidan (nilai IC_{50}) ekstrak etanol daun kembang bulan jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} asam askorbat, memiliki bioaktivitas antiradikal yang berbeda yaitu sangat kuat. Hal ini dipengaruhi karena struktur

dari asam askorbat memiliki karakteristik yang stabil dan dapat mendonorkan kedua hidrogen yang terikat pada gugus hidroksil terhadap radikal bebas sehingga membentuk struktur L- askorbil yang stabil. Hal ini mendukung bioaktivitas dari asam askorbat lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak etanol daun kembang bulan (Fitriansyah et al., 2017).

Tabel 1. Rendemen (%) ekstrak daun kembang bulan

Ekstrak	Bobot sampel (g)	Bobot ekstrak (g)	Rendemen (%)
Ekstrak etanol	850	88,77	10,44
Ekstrak etil asetat	850	47,21	5,55
Ekstrak <i>n</i> -heksana	850	1,78	0,20

Tabel 2. Potensi antioksidan ekstrak daun kembang bulan

Sampel	Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	Aktivitas peredaman (%)	Nilai IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>n</i> -Heksan	100	27,18 $\pm$ 0,00	191,57 $\pm$ 0,04
	150	40,43 $\pm$ 0,00	
	200	52,88 $\pm$ 0,00	
	250	64,66 $\pm$ 0,00	
	300	74,97 $\pm$ 0,00	
Etil asetat	40	32,73 $\pm$ 0,00	106,47 $\pm$ 0,04
	80	37,71 $\pm$ 0,00	
	120	54,81 $\pm$ 0,00	
	160	67,49 $\pm$ 0,00	
	200	77,35 $\pm$ 0,00	
Etanol	20	20,04 $\pm$ 0,00	56,71 $\pm$ 0,06
	40	40,77 $\pm$ 0,00	
	60	50,85 $\pm$ 0,00	
	80	66,14 $\pm$ 0,00	
	100	84,94 $\pm$ 0,00	
Vitamin C	3	28,45 $\pm$ 0,00	10,46 $\pm$ 0,04
	6	33,97 $\pm$ 0,00	
	9	43,84 $\pm$ 0,00	
	12	55,51 $\pm$ 0,00	
	15	65,16 $\pm$ 0,00	

Kesimpulan

Aktivitas antioksidan daun kembang bulan dengan metode ABTS dipengaruhi oleh kepolaran cairan penyari. Semakin polar cairan penyari maka aktivitas antioksidan semakin kuat dengan nilai IC_{50} masing-masing dari etanol, etil asetat, dan n-heksan sebesar 56,71 $\mu\text{g/ml}$ (kategori kuat), 106,47 $\mu\text{g/ml}$ (kategori sedang), dan 191,57 $\mu\text{g/ml}$ (kategori lemah).

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini

Daftar Pustaka

- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., & Hagen, T. M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Vol. 90, Issue 17). <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
- Andini Koptaria, Nawawi, S., & Nigsih, J. R. (2019). Daya antibakteri berbagai konsentrasi ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl) A. Gray) Terhadap Bakteri *Porphyromonas gingivalis* Dominan Periodontitis (In Vitro). *Naskah Publikasi*, 1.
- Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2013). The importance of solvent type in estimating antioxidant properties of phenolic compounds by ABTS assay. *European Food Research and Technology*, 236(6). <https://doi.org/10.1007/s00217-013-1982-1>
- Dayan, N., & Kromidas, L. (2011). Formulating, packaging, and marketing of natural cosmetic products. In *Formulating, Packaging, and Marketing of Natural Cosmetic Products*. <https://doi.org/10.1002/9781118056806>
- Depkes RI. (2000). Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat: Jakarta Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Edisi IV*.
- Dong, J. W., Cai, L., Xing, Y., Yu, J., & Ding, Z. T. (2015). Re-evaluation of ABTS-G+ assay for total antioxidant capacity of natural products. *Natural Product Communications*, 10(12). <https://doi.org/10.1177/1934578x1501001239>
- Fahmi, N., Herdiana, I., & Rubiyanti, R. (2020). Pengaruh metode pengeringan terhadap mutu simplisia daun pulutan (*Urena lobata* L.). *Media Informasi*, 15(2). <https://doi.org/10.37160/bmi.v15i2.433>
- Fitriansyah, S. N., Fidrianny, I., & Ruslan, K. (2017). Correlation of total phenolic, flavonoid and carotenoid content of *Sesbania sesban* (L. Merr) leaves extract with DPPH scavenging activities. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(1). <https://doi.org/10.25258/ijpapr.v9i1.8046>
- Isfahlan, A. J., Mahmoodzadeh, A., Hassanzadeh, A., Heidari, R., &

- Jamei, R. (2010). Antioxidant and antiradical activities of phenolic extracts from Iranian almond (*Prunus amygdalus* L.) hulls and shells. *Turkish Journal of Biology*, 34(2). <https://doi.org/10.3906/biy-0807-21>
- Lee, K. W., Kim, Y. J., Lee, H. J., & Lee, C. Y. (2003). Cocoa has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25). <https://doi.org/10.1021/jf0344385>
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. In *Free Radical Biology and Medicine* (60). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>
- Mulyani, D. (2017). Perbandingan daya hambat ekstrak etanol daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan daun tekelan (*Chromolaena odorata*) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Scientia : Jurnal Farmasi Dan Kesehatan*, 7(2). <https://doi.org/10.36434/scientia.v7i2.121>
- Pradiningsih, A., Pandanwangi Tw, S., & Aribowo, A. (2018). Pengaruh ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A.Gray) terhadap kadar glukosa darah tikus putih wistar yang diinduksi oleh aloxan. *Journal of Holistic and Health Sciences*, 1(2). <https://doi.org/10.51873/jhhs.v1i2.14>
- Saleh, M. A., Clark, S., Woodard, B., & Deolu-Sobogun, S. A. (2010). Antioxidant and free radical scavenging activities of essential oils. *Ethnicity & Disease*, 20(1 Suppl 1).
- Selawa, W., Runtuwene, M. R. J., & Citraningtyas, G. (2013). Kandungan flavonoid dan kapasitas antioksidan total ekstrak etanol daun binahong. *Pharmacon*, 2(01).
- Shalaby, E. A., & Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *Indian Journal of Marine Sciences*, 42(5).
- Umayah, E., & Amrun, M. (2007). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Naga (*Hylocereus undatus* (Haw .) Britt. & Rose). *Jurnal Ilmu Dasar*, 8(1).
- Winarsi, H. (2007). Antioksidan alami dan radikal bebas. Yogyakarta: Kanisius. *Journal of Medicinal Plants Research*, 21(6).
- Zirconia, A., Kurniasih, N., & Amalia, V. (2015). Identifikasi senyawa flavonoid dari daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia*) dengan metode pereaksi geser. *Al-Kimiya*, 2(1). <https://doi.org/10.15575/ak.v2i1.346>