

# ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN MAREME (*Glochidion arborescens* (Müll. Arg.) Boerl.) DENGAN METODE DPPH, FRAP, dan ABTS

Haryoto<sup>1</sup> , Edtano Trinanda

<sup>1</sup> Department of Chemistry Pharmacy, Universitas Muhammadiyah Surakarta  
Jalan Achmad Yani no 157, Pabelan, Kartasura, Sukoharjo, Jawa Tengah, Indonesia 57169

 [har254@ums.ac.id](mailto:har254@ums.ac.id)

## Abstract

One of the things that are problems of the current world crisis is increasing pollution and one of them is increasing free radicals. Compounds that can inhibit free radicals are antioxidants, which are chemical compounds that can donate one or more electrons to free radicals so the use of antioxidant compounds is growing rapidly. Thus, the development of sources of antioxidants that can be used as medicines began, there have been several studies proving that several plants have antioxidant properties, one of which is the mareme plant (*Glochidion arborescens* Blume) where the mareme plant is often consumed by the surrounding community, especially the Sundanese. In this research, the mareme leaves used to test the antioxidant properties were viscous extracts and several methods were used to test the antioxidants, namely DPPH, FRAP, and ABTS. The average result of the IC<sub>50</sub> value from the DPPH, FRAP, and ABTS methods respectively was 42.6; 45.05; dan 38.4mg/L. To determine the compound content of mareme leaves, a phytochemical test was carried out on the plant. From the results of phytochemical tests, it was found that mareme leaves contain flavonoids, tannins, and saponins which are flavonoid compounds that have antioxidant properties. And it can be concluded that Mareme Leaf Ethanol Extract contains very strong antioxidant compounds with the ABTS method. Based on the ANOVA test, the average IC<sub>50</sub> value of the three antioxidant test methods was "different".

**Keywords:** *Antioxidant, mareme, DPPH, FRAP, ABTS*

## Abstrak

Salah satu hal yang menjadi masalah krisis dunia sekarang adalah dengan meningkatnya polusi dan salah satunya adalah meningkatnya radikal bebas, senyawa yang dapat menghambat radikal bebas adalah antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas sehingga penggunaan senyawa antioksidan berkembang dengan pesat. Sehingga dimulai lah pengembangan tentang sumber antioksidan dapat dijadikan obat-obatan, terdapat beberapa penelitian membuktikan bahwa beberapa tumbuhan yang memiliki sifat antioksidan salah satunya tumbuhan mareme (*Glochidion arborescens* Blume) yang dimana tumbuhan mareme ini sering dikonsumsi oleh masyarakat sekitar terutama suku sunda. Di dalam penelitian ini daun mareme yang digunakan untuk menguji sifat antioksidan merupakan ekstrak kental dan metode uji antioksidannya digunakan beberapa metode yaitu DPPH, FRAP, dan ABTS. Hasil rata-rata nilai IC<sub>50</sub> dari metode DPPH, FRAP, dan ABTS berturut-turut adalah 42,6; 45,05; dan 38,4 mg/L. Selanjutnya untuk mengetahui kandungan senyawa daun tumbuhan mareme dilakukan uji fitokimia, didapatkan senyawa flavonoid, tanin, dan saponin. Senyawa falvonoid pada umumnya memiliki sifat sebagai antioksidan. Berdasarkan penjelasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol Daun tumbuhan Mareme mengandung senyawa antioksidan dengan metode ABTS yang sangat kuat. Berdasarkan uji ANOVA, nilai IC<sub>50</sub> dari ketiga metode uji antioksidan "berbeda".

**Kata kunci:** *Antioksidan, mareme, DPPH, FRAP, ABTS.*

# 1. Pendahuluan

Dimasa sekarang polusi dapat di jumpai dimana saja, salah satu contoh polusi yang sangat berbahaya adalah radikal bebas. Radikal bebas adalah suatu atom atau molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan tersebut menyebabkan radikal bebas sangat reaktif yang kemudian akan menangkap atau mengambil elektron dari senyawa lain seperti protein, lipid, karbohidrat, dan DNA untuk menetralkan diri (Liochev, 2013).

Beberapa wilayah di dunia saat ini mengalami peningkatan polusi yang signifikan. Pencemaran ini banyak mengandung senyawa radikal bebas yang dapat menimbulkan berbagai penyakit. Radikal bebas adalah molekul yang relatif tidak stabil dengan atom di orbital terluarnya mengandung satu atau lebih atom elektron tidak berpasangan (Robins, 2007:10). Reaksi radikal ini dapat dihambat oleh senyawa antioksidan. Antioksidan adalah senyawa kimia yang dapat menyumbangkan satu atau lebih elektron kepada radikal bebas. Senyawa antioksidan sebagai penangkal radikal bebas, dapat tumbuh dengan cepat baik dalam makanan maupun dalam obat-obatan (Jacob dan Burri, 1996).

Menurut Purwanto (2017) senyawa antioksidan banyak terdapat pada tumbuhan, baik pada bunga, daun maupun buah. Tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, alkaloid dan terpenoid merupakan bahan baku potensial untuk dijadikan sebagai antioksidan alami. Mareme (*Glochidion arborescens Blume*) dari famili *Glochidion* dikenal sebagai tumbuhan liar yang tumbuh subur di hutan dan kemungkinan memiliki aktivitas antioksidan mengacu pada beberapa penelitian sebelumnya yang telah dilakukan (Indra et al., 2019) terhadap aktivitas beberapa tumbuhan dari genus *Glochidion*, yaitu:

*Glochidion daltonii*, *Glochidion ellipticum* dan *Glochidion hypoleucum* telah berhasil mengisolasi lima senyawa polifenol. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya, dapat diketahui bahwa tumbuhan dari genus *Glochidion* berpotensi untuk dikembangkan secara terapeutik dan perlu eksplorasi lebih lanjut untuk spesies berbeda yang belum diteliti. Senyawa dalam tumbuhan dalam famili *Glochidion* antara lain seskuiterpenoid, triterpenoid, glochidonol, glochidiol, glochidon dan glikosida (Sandhya, 2010).

Golongan senyawa turunan fenol seperti flavonoid yang merupakan salah satu kandungan senyawa yang terdapat di daun mareme yang memiliki sifat antioksidan yang sangat aktif. Sistem kerja antioksidan secara umum dibagi menjadi dua, yaitu enzimatik: Superoxide dismutase (SOD), Katalase (CAT), Peroksidase (POX), Asam askorbat peroksidase (APX), glutathion reduktase (GR) dan polifenol oksidase (PPO) dan non-enzimatik; contohnya asam askorbat (vitamin C), senyawa fenolik, karotin dan  $\alpha$ -tokoferol. Pengujian aktivitas antioksidan non enzimatis pada tanaman dan bahan pangan umumnya dapat menggunakan metode yang berbasis air 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) (reaksi dengan radikal bebas), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) (reaksi reduksi-oksidasi), dan 2,2-azinobis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid (ABTS) (perendaman radikal bebas). Banyaknya metode uji aktivitas antioksidan tersebut dapat memberikan hasil uji yang beragam.

Hal ini disebabkan pengaruh struktur kimia antioksidan, asal bebas dan sifat fisikokimia preparat sampel yang berbeda. Oleh karena itu, pemilihan metode analisis aktivitas antioksidan yang tepat dan selektif untuk jenis sampel tertentu sangat penting. Dalam penelitian ini dilakukan dengan tiga metode uji antioksidan yaitu DPPH, FRAP dan ABTS. Selain itu, korelasi antara ketiga metode eksperimen juga diselidiki. Oleh karena itu, perlu dilalukan penelitian untuk menentukan kandungan metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun mareme (*Glochidion arborescens Blume*) dengan uji DPPH radikal bebas, FRAP dan ABTS dan membandingkan hasil percobaan dari ketiga metode tersebut menggunakan analisis ANOVA.

## 2. Metode

### 2.1 METODE UJI KANDUNGAN METABOLIT SEKUNDER

#### 2.1.1 Flavonoid

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 3-7 tetes, dimasukkan beberapa tetes larutan  $H_2SO_4$ , dilihat perubahan warna. Senyawa flavonoid terdeteksi bila larutan berubah menjadi merah tua atau kuning (Puspa et al, 2017).

#### 2.1.2 Tanin

Dimasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, ditambahkan air panas sebanyak 10 mL, kemudian dididihkan dengan hotplate selama 5 menit. Ditambahkan  $FeCl_3$  sebanyak 3-4 tetes dan dilihat perubahan warna. Tanin pirogalol terdeteksi apabila warna berubah menjadi biru hitam sedangkan tanin katekol terdeteksi apabila warna berubah menjadi hijau biru (hijau-hitam) (Muthmainnah, 2017).

#### 2.1.3 Saponin

Dilarutkan ekstrak ke dalam 10 mL akuades, kemudian dipanaskan dan disaring. Dikocok kuat ekstrak 30 detik dan dilihat perubahan yang terjadi. Saponin terdeteksi apabila terdapat busa setinggi 1 cm (Ambarsari dan Haryoto, 2022).

#### 2.1.4 Triterpenoid dan steroid

Masing-masing ekstrak daun tumbuhan mareme dilarutkan ke dalam 0,5 mL kloroform, lalu ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Kemudian campuran tadi ditetesi dengan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Bila dari campuran tadi terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid. Bila terbentuk cincin berwarna kecoklatan atau violet menunjukkan adanya kandungan triterpenoid (Jones and kinghorn, 2006; Evans, 2009).

### 2.2 METODE ANTIOKSIDAN

Uji aktivitas antioksidan pada daun mareme digunakan 3 metode yaitu: DPPH, FRAP, dan ABTS. Ketiga metode tersebut digunakan untuk mengetahui perbandingan aktivitas antioksidan daun mareme.

#### 2.2.1 DPPH

Metode DPPH pada penelitian ini dilakukan berdasarkan prosedur uji aktivitas antioksidan dengan metode yang digunakan oleh Ikhrar et al (2019) dan juga Puspitasari (2016) dengan sedikit modifikasi .

#### **Pembuatan Larutan Stok**

Sebanyak 100 mg ekstrak daun tumbuhan mareme dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a. Dengan masing-masing konsentrasi: 100, 75, 50, dan 25 mg/L, dihitung dengan menggunakan rumus pengenceran, yaitu :

$$V_1.M_1 = V_2.M_2 \quad (2)$$

Dari masing-masing hasil yang didapatkan dari hasil  $V_1$  kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup dengan menggunakan aluminium foil untuk digunakan pada perlakuan selanjutnya.

#### **Pembuatan Larutan DPPH**

Sebanyak 4 mg DPPH ditimbang dan dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 100 mL. Selanjutnya larutan yang di buat untuk uji aktivitas antioksidan yaitu ekstrak etanol daun mareme di pipet sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukan kedalam tabung reaksi dengan masing-masing konsentrasi: 100, 75, 50, dan 25 mg/L, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH kedalam masing-masing kosentrasi. Sampel dibuat sebanyak 3 kali pengulangan.

#### **Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH**

Panjang gelombang maksimum dipilih berdasarkan panjang gelombang yang dapat memberikan absorbansi DPPH maksimal. Pada penelitian ini dilakukan pengamatan absorbansi larutan kontrol DPPH 40  $\mu$ g/mL dan larutan uji konsentrasi tertinggi pada panjang gelombang 450-550 nm.

#### **Pembuatan Larutan Vitamin C**

Vitamin C p.a ditimbang sebanyak 25 mg. Kemudian, dilarutkan dalam metanol p.a sebanyak 25 mL, Untuk uji aktivitas antioksidan diambil larutan vitamin C dengan konsentrasi yang sama  $V_1$ , yaitu konsentrasi: 100, 75, 50, dan 25 mL dengan

ditambahkan masing-masing larutan dengan 1 mL larutan DPPH. Lalu, ditambahkan metanol p.a mencapai tanda batas (10 mL), dengan pengulangan sebanyak 3 kali pada masing-masing konsentrasi. Sampel vitamin C p.a diuji pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 539 nm.

#### **Penentuan Operating Time**

Tahapan ini bertujuan menentukan waktu optimum inkubasi sampel dengan larutan DPPH untuk bereaksi sempurna. Bahan uji ekstrak dengan kontrol positif vitamin C murni yang direaksikan dengan larutan DPPH dan diamati absorbansinya pada panjang gelombang 539 nm di menit ke-0 hingga menit ke-60 dengan interval waktu 5 menit. Operating time dipilih pada saat penurunan absorbansi yang dihasilkan relatif stabil.

#### **Pengujian Larutan Kontrol DPPH dan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH**

Larutan kontrol DPPH diuji pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 539 nm sebagai absorbansi kontrol dalam pengujian ini. Sampel diinkubasi selama 35 menit pada suhu 37°C. Untuk mengetahui aktivitas dari penangkal radikal bebas tersebut, di uji pada spektrofotometer. Berubahnya warna ungu menjadi warna kuning menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas. Diukur absorbansi pada spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 539 nm setelah diinkubasi selama 30 menit berubahnya warna menjadi kuning menunjukkan bahwa, masing-masing konsentrasi menunjukkan efisiensi penangkal radikal bebas di uji dengan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 539 nm. Kemudian diamati perbandingannya dengan vitamin C p.a sebagai standar. Aktivitas penangkapan radikal bebas (% inhibisi) dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\% \quad (3)$$

#### **2.2.2 FRAP**

Metode FRAP yang digunakan berdasarkan modifikasi dari penelitian yang dilakukan oleh Esati et al (2022) dan Maryam, St (2015).

#### **Pembuatan Larutan Stok**

Sebanyak 100 mg ekstrak daun tumbuhan mareme dilarutkan dalam 100 mL metanol p.a. Dengan masing-masing konsentrasi: 60, 70, 80, 90, dan 100 mg/L,

#### **Penyiapan Larutan Kurva Baku**

Larutan stok 1000 ppm dibuat dengan melarutkan 25 mg asam askorbat yang dilarutkan dengan metanol p.a hingga batas labu ukur 25 mL. Selanjutnya dari larutan stok 1000 ppm diambil masing-masing 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; dan 1,0 mL dan ditempatkan dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan diencerkan dengan metanol p.a hingga 10 mL dan dihomogenkan. Konsentrasi larutan standar 1000 ppm asam askorbat yakni 60, 70, 80, 90, 100 mg/L.

#### **Penyiapan Pada Larutan**

##### **1. Larutan Dapar Fosfat 0,2 M pH 6,6**

Larutan dibuat sesuai Farmakope Indonesia dengan menimbang 2 gram NaOH dan dilarutkan dengan akuades bebas CO<sub>2</sub> hingga tepat 250 mL dalam labu takar. Kemudian sebanyak 6,8 gram KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> yang dilarutkan dengan akuades bebas CO<sub>2</sub> 250 mL dalam labu takar. Kemudian dipipet sebanyak 16,4 mL NaOH dimasukkan dalam labu takar dan dicampurkan 50 mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, selanjutnya diukur sampai pH 6,6 dan dicukupkan dengan akuades bebas CO<sub>2</sub> hingga 200 mL.

##### **2. Larutan oksalat 1%**

Larutan disiapkan dengan melarutkan 250 mg asam oksalat dalam air bebas CO<sub>2</sub> dan diencerkan dalam labu takar 25 mL.

##### **3. Larutan Kalium Ferrisianida 1%**

Larutan disiapkan dengan melarutkan 250 mg kalium ferrisianida dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 25 mL.

##### **4. Larutan FeCl<sub>3</sub> 0,1%**

Larutan disiapkan dengan melarutkan 25 mg FeCl<sub>3</sub> dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 25 mL.

##### **5. Larutan asam trikloroasetat (TCA) 10%**

Larutan disiapkan dengan melarutkan 2,5 gram TCA dalam akuades dan diencerkan dalam labu takar 25 mL.

#### **Penentuan Panjang Gelombang dan Operating Time**

Diambil 1 mL dari larutan stok 100 ppm vitamin C murni, kemudian ditambahkan 1 mL metanol p.a vitamin C, 1 mL dapar fosfat, dan 1 mL  $K_3Fe(CN)_6$  1%. Larutan digojog dan diinkubasi selama 20 menit dalam suhu  $50^\circ C$ . Lalu ditambahkan 1 mL TCA dan disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Diambil 1 mL supernatan ditambah 0,5 mL  $FeCl_3$  0,1% dan metanol p.a hingga tanda batas dalam labu ukur 5 mL. Diinkubasi selama 10 menit dan diukur absorbansi di 400-800 nm. Operating Time diukur  $\lambda$  maks tiap 1 menit hingga stabil pada menit ke-1 sampai menit ke-30.

#### **Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP**

Larutan ekstrak daun mareme dan larutan standar vitamin C dengan variasi konsentrasi: 60, 70, 80, 90, dan 100 mg/L dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan 1 mL dapar fosfat 0,2 M (pH 6.6) dan 1 mL  $K_3Fe(CN)_6$  1% setelah itu, diinkubasi selama 20 menit dengan suhu  $50^\circ C$ . Setelah diinkubasi ditambahkan 1 mL TCA lalu disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifugasi dipipet 1 mL lapisan bagian atas kedalam tabung reaksi, dan ditambahkan 1 mL metanol p.a dan 0,5 mL  $FeCl_3$  0,1%. Larutan didiamkan selama 10 menit dan diukur absorbansinya pada 691 nm. Sebagai blanko digunakan campuran larutan metanol. Pengukuran ini dilakukan replikasi sebanyak 2 kali. Data-data absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung %RP. Selanjutnya untuk memperoleh Reducing curve, diplot konsentrasi ekstrak dengan nilai % RP, dari kurva tersebut akan diperoleh persamaan regresi linear  $y = bx + a$ , yang digunakan untuk menghitung nilai  $IC_{50}$ . % RP dihitung dengan menggunakan persamaan 3:

$$\%RP = \left[ 1 - \left( 1 - \frac{\text{Abs kontrol vit.C}}{\text{Abs sampel}} \right) \times 100\% \right] \quad (4)$$

#### **2.2.3 ABTS**

Pada penelitian ini berdasarkan cara kerja Sami et al (2016) dengan sedikit modifikasi.

#### **Pembuatan Larutan Stok ABTS**

- Larutan a : Ditimbang 7,1015 mg ABTS, dilarutkan dalam 5 mL akuades. Diinkubasi selama 12 jam.
- Larutan b : Ditimbang 3,500 mg  $K_2S_2O_8$ , dilarutkan dalam 5 mL akuades. Diinkubasi selama 12 jam
- Larutan a dan b dicampur dalam ruang gelap dan cukupkan volumenya dengan metanol p.a sampai 25 mL.

#### **Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Metode ABTS**

- Pengukuran Serapan Larutan Blanko ABTS

Larutan ABTS dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan metanol p.a dalam labu terukur. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

- Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas ABTS dengan Sampel

Larutan stok sampel ekstrak daun mareme 1000 ppm dipipet masing-masing 50  $\mu L$ , 100  $\mu L$ , 150  $\mu L$ , 200  $\mu L$ , dan 250  $\mu L$ , campuran ditambah 1 mL larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan metanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu diukur serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm. Besarnya daya antioksidan dihitung dengan rumus :

$$\text{Daya antioksidan} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100\% \quad (5)$$

- Pengukuran Aktivitas Pengikatan Radikal bebas ABTS dengan vitamin C murni  
Pengujian dilakukan dengan memipet masing-masing 15  $\mu L$ , 20  $\mu L$ , 25  $\mu L$ , 30  $\mu L$ , dan 35  $\mu L$  dari larutan stok vitamin C murni 1000 ppm, campuran ditambah 1 mL larutan ABTS lalu dicukupkan volumenya sampai 5 mL dengan metanol p.a sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm dan 7

ppm. Selanjutnya dihomogenkan lalu serapan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 750 nm.

### 2.3 UJI ANOVA

Menurut Ostertagova and Oskar (2013) Analisis varians (ANOVA) adalah prosedur statistik yang berkaitan dengan membandingkan beberapa sampel. Uji anova merupakan perpanjangan dari uji-t untuk dua sampel independen atau lebih yang berasal dari dua atau lebih kelompok yang berbeda. Tujuannya adalah untuk menguji perbedaan yang signifikan antara kelas berarti dengan analisis varians. Uji ANOVA terhadap hipotesis didasarkan pada sebuah perbandingan dua perkiraan independen dari varians populasi. Saat melakukan prosedur ANOVA diperlukan asumsi:

- Pengamatan tidak tergantung satu sama lain.
- Pengamatan di setiap kelompok berasal dari distribusi normal.
- Variansi populasi pada setiap kelompok adalah sama (homogenitas)

## 3. Hasil dan Pembahasan

Tumbuhan Mareme (*Glochidion arborescens Blume*) telah dideterminasi di Herbarium Jatinangor, Laboratorium Taksonomi Tumbuhan jurusan Biologi Farmasi Universitas Padjadjaran, dengan nomor surat keterangan; 50/HB/01/2022.

### 3.1 Ekstrak Etanol Daun Tumbuhan Mareme dan Uji Kandungan Metabolit Sekunder

Data hasil rendemen diperlukan untuk mengetahui banyaknya ekstrak yang diperoleh selama ekstraksi dari suatu sampel. Data hasil rendemen berhubungan dengan banyaknya kandungan senyawa aktif pada sampel. Hal ini didukung oleh literatur Nurhayati et al (2009) tingginya senyawa bioaktif yang terdapat pada suatu sampel ditunjukkan dengan tingginya nilai rendemen yang dihasilkan.

Pada hasil ekstraksi didapatkan ekstrak kental hitam etanol daun mareme sebanyak 1,21 gram, pada proses ekstraksi digunakan 70,50 gram simplisia, sehingga didapatkan rendemen ekstrak sebesar 1,72%. Berdasarkan literatur Molyneux, P. (2004) dimana persen rendemen merupakan perbandingan antara hasil banyaknya metabolit yang didapatkan setelah ekstraksi dengan bobot sampel/simplisia kering yang digunakan. Rendemen yang baik adalah rendemen yang nilainya melebihi 10%. Hasil ekstrak etanol daun mareme yang didapatkan pada penelitian ini dinyatakan kurang baik. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstrak yang didapatkan yaitu lamanya waktu ekstraksi, size sampel, keadaan penyimpanan, dan perbandingan jumlah pelarut dengan jumlah sampel.

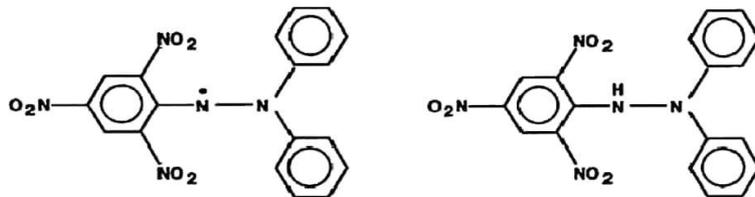
Uji kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak etanol daun mareme diperoleh senyawa flavonoid, tanin, saponin, sedangkan untuk steroid dan triterpenoid menunjukkan hasil yang negatif. Pada hasil uji flavonoid didapatkan perubahan warna larutan menjadi merah tua. Uji tanin ditemukan adanya perubahan warna pada hasil uji yaitu, biru hitam, sehingga positif mengandung senyawa tanin pirogalol. Dalam uji saponin didapatkan hasil adanya busa setinggi 1 cm. Pada uji steroid tidak terjadi perubahan warna hijau kebiruan dan tidak ditemukan adanya cincin berwarna kecoklatan atau violet sehingga negatif mengandung triterpenoid.

### 3.2 Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Mareme

Pada penelitian ini menggunakan 3 metode uji aktivitas antioksidan yaitu, DPPH, FRAP, dan ABTS. Larutan uji diukur pada spektrofotometer UV-Vis. Aktivitas antiradikal bebas ditunjukkan dengan nilai  $IC_{50}$ . Nilai  $IC_{50}$  merupakan nilai konsentrasi antioksidan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas. Kategori  $IC_{50}$  menurut Rumagit dkk (2015) dalam jurnal Fauziah et al (2021) dibagi menjadi: <50 (Sangat kuat); 50 – 100 (kuat); 100 – 150 (sedang); 150 – 200 (lemah); dan >200 (sangat lemah) Larutan pembanding yang digunakan pada uji tersebut adalah vitamin C. Vitamin C digunakan sebagai kontrol positif karena memiliki aktivitas antioksidan yang baik, hal ini dibuktikan berdasarkan review jurnal Jackie dan Dika (2017) dimana vitamin C memiliki nilai  $IC_{50}$  yang lebih rendah dibandingkan dengan  $IC_{50}$  vitamin A dan vitamin E bila diuji dengan

metode DPPH, sehingga memiliki aktivitas antioksidan yang paling baik. Pelarut yang digunakan adalah metanol yang dapat melarutkan sampel dan vitamin C berdasarkan Susanti (2012) metanol merupakan senyawa polar yang disebut sebagai pelarut universal karena selain mampu mengekstrak komponen polar juga dapat mengekstrak komponen nonpolar seperti lilin dan lemak.

Pada uji pertama dilakukan dengan peredaman radikal 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl atau sering disebut sebagai DPPH, merupakan metode yang paling sering digunakan dalam penetapan aktivitas antioksidan. Berdasarkan pada delokalisasi elektron cadangan di atas molekul secara keseluruhan DPPH memiliki sifat yang stabil sebagai radikal bebas, sehingga molekulnya tidak mengalami dimerisasi, seperti yang terjadi pada kebanyakan radikal bebas lainnya.

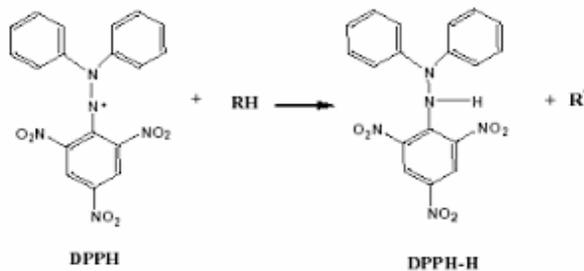


1: Diphenylpicrylhydrazyl (free radical)

2: Diphenylpicrylhydrazine (nonradical)

**Gambar 1. Struktur DPPH (Molyneux, 2004)**

Dengan demikian, delokalisasi elektron menimbulkan warna ungu tua, ditandai dengan pita serapan dalam larutan organik yang berpusat pada sekitar 539 nm. Ketika larutan radikal DPPH dicampur dengan molekul antioksidan, yang dapat menyumbangkan atom hidrogen, reaksi tersebut menimbulkan terjadinya bentuk tereduksi dari DPPH yang ditandai dengan hilangnya warna ungu (Gulcin, 2020). Pudarnya warna ini ditandai pula dengan penurunan absorbansi DPPH pada panjang gelombang maksimum yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Perubahan warna tersebut menunjukkan kemampuan sampel atau ekstrak dalam merendahkan aktivitas radikal bebas DPPH (Molyneux, 2004).



**Gambar 2. Reaksi DPPH dengan antioksidan (Purwaningsih, Sri, 2012)**

Pada penentuan panjang gelombang maksimal ( $\lambda$  maks), berdasarkan hasil pengukuran serapan maksimum larutan DPPH 0,4 mM dalam metanol p.a dengan spektrofotometri UV-Vis dalam rentang 450-550 nm diperoleh serapan maksimum pada panjang gelombang 539 nm dengan nilai absorbansi 0,665. Absorbansi larutan DPPH yang diperoleh digunakan sebagai absorbansi kontrol. Absorbansi kontrol DPPH ini digunakan untuk menghitung persen (%) aktivitas antioksidan, yang selanjutnya untuk menghitung  $IC_{50}$ .

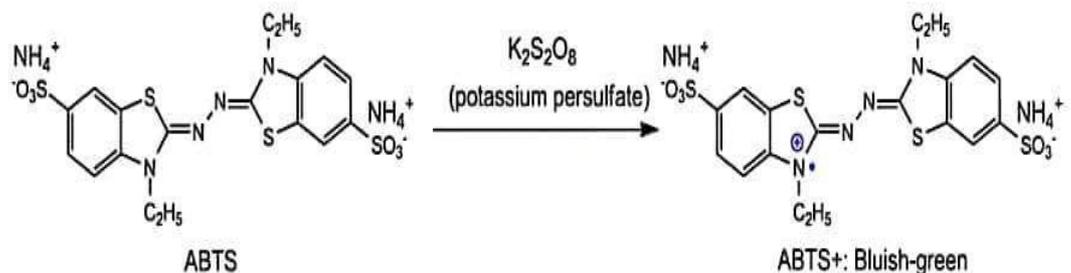
Penentuan operating time digunakan untuk menentukan waktu yang paling tepat dalam meredam radikal bebas DPPH. Penentuan operating time dengan pengambilan konsentrasi 50 mg/L ekstrak etanol daun mareme yang direaksikan dengan larutan DPPH 0,4 mM. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 539 nm dan diukur pada rentang waktu 5 menit, dihasilkan waktu yang stabil. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada menit ke-35, absorbansi DPPH relatif konstan, sehingga uji aktivitas antioksidan selanjutnya dilakukan pada menit ke-35. Berdasarkan hasil uji hasil absorbansi vitamin c dan sampel pada konsentrasi 100, 75, 50, dan 25 mg/L, semakin besar konsentrasi maka semakin kecil nilai absorbansi. Untuk % inhibisi didapatkan hasil semakin besar

konsentrasi maka semakin besar pula % inhibisinya. Hasil pengukuran dari sampel ekstrak etanol daun mareme memiliki aktivitas antioksidan, yang mempunyai  $IC_{50}$  sebesar 45,6 mg/L.

Pada uji selanjutnya dilakukan dengan metode FRAP. Prinsip dari uji FRAP yaitu mengukur reduksi kompleks ion Feri ( $Fe^{3+}$ )-ligan menjadi kompleks Fero ( $Fe^{2+}$ ) yang berwarna biru oleh sampel dalam kondisi asam. Aktivitas antioksidan dari senyawa yang diuji ditentukan sebagai peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 593 nm, dan hasilnya dapat dinyatakan sebagai ekuivalen mikromolar  $Fe^{2+}$  atau standar antioksidan. Tidak seperti metode berbasis elektron transfer lainnya, uji FRAP dilakukan dalam kondisi pH asam (pH 3,6) untuk mempertahankan kelarutan besi dan mendorong terjadinya transfer elektron. Uji FRAP asli menggunakan tripyridyltriazine (TPTZ) sebagai ligan untuk mengikat besi. Namun saat ini, kalium ferrisianida menjadi pilihan reagen yang paling populer untuk digunakan dalam pengujian FRAP. Terbentuknya warna biru prusia sebagai produk akhir dapat diukur secara spektrofotometri dan digunakan untuk menunjukkan daya reduksi antioksidan yang diuji. (Shahidi et al, 2015). Hasil yang didapat jauh berbeda dengan penelitian Rahayu, Supiani dkk (2021) didapat  $\lambda$  maks 413,6 nm. Adanya perbedaan yang signifikan ini dapat disebabkan oleh tingkat kemurnian reagen dan pelarut yang dipakai berbeda, stok larutan ppm yang dipakai juga berbeda. Pada penentuan panjang gelombang dan operating time didapatkan panjang gelombang maksimal 691 nm dan untuk OT stabil pada menit ke-8 sampai menit ke-11.

Berdasarkan hasil uji hasil absorbansi vitamin C dan sampel berbanding terbalik dengan metode DPPH, semakin besar konsentrasi maka semakin besar juga nilai absorbansi. Selanjutnya % RP didapatkan hasil semakin besar konsentrasi maka semakin kecil % RP. Berdasarkan hasil data uji FRAP didapatkan rata-rata nilai  $IC_{50}$  sebesar 119,05 mg/L dikategorikan sedang terhadap antioksidan. Nilai  $IC_{50}$  aktivitas antioksidan metode FRAP lebih tinggi dibandingkan dengan metode DPPH (Yolanda,2021).

Pada uji selanjutnya dengan menggunakan metode ABTS. Pengujian ABTS berdasarkan pada generasi  $ABTS^+$  biru/hijau yang dapat direduksi oleh antioksidan. Flavonoid bereaksi dengan kation  $ABTS^+$  membentuk  $ABTS$  radikal yang lebih stabil atau senyawa bukan radikal.



**Gambar 3. Mekanisme reaksi ABTS**

Dalam hal ini terjadi oksidasi radikal dimana intensitas warna berkurang karena direduksi oleh molekul ABTS dan terjadi perubahan warna menjadi hijau-biru. Antioksidan seperti flavonoid menekan pembentukan warna karena terjadi reduksi  $ABTS^+$  sehingga terjadi penurunan absorbansi.

Dari hasil uji ABTS didapatkan nilai  $IC_{50}$  ekstrak daun sebesar 42,40 mg/L sedangkan larutan pembanding vitamin C sebesar 4,51 mg/L. Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  diperoleh kekuatan antioksidan vitamin C sama dengan hasil dari uji DPPH yakni lebih baik dibandingkan dengan sampel. Namun keduanya sama-sama termasuk ke dalam kategori sangat kuat. Pada metode ABTS ini, sampel ekstrak daun mareme memiliki kategori  $IC_{50}$  sangat kuat berbeda dengan hasil DPPH dan FRAP sehingga uji ABTS lebih sensitif terhadap aktivitas senyawa antioksidan pada sampel. Selain itu, cara pembuatannya yang lebih mudah dan simple

menjadikan metode ini memiliki kelebihan dibandingkan dengan metode DPPH dan FRAP, namun tetap memiliki kekurangan yaitu terdapat waktu inkubasi yang cukup lama.

Selanjutnya dilakukan uji One Way Anova berdasarkan Raharjo, Sahid (2023) dengan langkah-langkah sebagai berikut:

1. Melakukan uji Normalitas Shapiro Wilk

Uji normalitas Shapiro Wilk dipilih karena menurut literatur Quraisy, Andi (2020) uji Shapiro Wilk adalah sebuah metode atau rumus perhitungan sebaran data yang dibuat oleh shapiro dan wilk merupakan metode uji normalitas yang efektif dan valid digunakan untuk sampel berjumlah kecil dan dibatasi untuk ukuran sampel yang kurang dari 50.

2. Melakukan uji Homogenitas

3. Melakukan uji One Way Anova

Dasar Pengambilan Keputusan Uji Normalitas

1. Jika nilai sig. > 0,05, maka data berdistribusi normal
2. Jika nilai sig. < 0,05, maka data berdistribusi tidak normal

Berdasarkan hasil uji Anova, diketahui nilai sig sebesar  $0,003 < 0,05$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata nilai IC<sub>50</sub> pada ketiga metode uji antioksidan tersebut “BERBEDA” secara signifikan.

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini, diketahui bahwa ekstrak etanol daun Mareme (*Glochidion arborescens* Blume) mengandung senyawa metabolit sekunder saponin, flavonoid, dan tannin. Ketiga metode ABTS, DPPH dan FRAP pada pengujian aktivitas antioksidan terhadap ekstrak daun tumbuhan Mareme (*Glochidion arborescens* Blume) masing-masing mempunyai nilai IC<sub>50</sub> sebesar 38,40; 42,60 dan 45,05 Mg/mL. Metode ABTS lebih sensitif dibanding metode DPPH dan FRAP.

## Referensi

- Ambarsari N. and Haryoto. (2022). Isolasi dan Identifikasi Ekstrak Etanol Daun Mareme (*Glochidion arborescens* Blume.) Isolation and Identify of Ethanol Extract of Mareme Leaves (*Glochidion arborescens* Blume.), *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 7 (3), 429–438.
- Anggraini dan Nabillah. (2018). Activity Test of Suji Leaf Extract (*Dracaena angustifolia* Roxb.) on in vitro cholesterol lowering. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*, 21(2): 54-58.
- Esati et. al. (2022). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) dengan Metode DPPH dan FRAP serta Pengaplikasiannya sebagai Zat Aktif dalam Losion, *J. Sains Kes*, Vol 4. No 4. p-ISSN: 2303-0267, e-ISSN: 2407-6082.
- Evans, C.W. (2009). *Pharmacognosy Trease and Evans*, 16<sup>th</sup> Ed. London: Saunders Elviesier.
- Fauziah et. al. (2021). Uji Antioksidan Ekstrak Daun Tanaman Leunca (*Solanum nigrum* L.) Antioxidant Test Leunca Plant Leaf Extract (*Solanum nigrum* L.), *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 8(1): 28-34.
- Floegel, A. et. al. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.*, 24(7), 1043–1048. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2011.01.008>.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651-715. doi:10.1007/s00204-020-02689-3.
- Ikhrar, Muhammad Setiawan et. Al. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan *Stylissa* sp. dengan Metode DPPH (1,1-*difenil-2-pikrilhidrazid*), *PHARMACON*, Vol. 8, No. 4.
- Indra et. al. (2019). Fenolik Total, Kandungan Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Mareme (*Glochidion arborescens* Blume.), *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*.

- Jackie dan Dika. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan metode DPPH. *Farmaka Suplemen*, Volume 15 Nomor 1.
- Jacob R. A. and Burri B. J. (1996). The Oxidative Damage and Defense. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(6): 986-990.
- Jones, W.P. dan Kinghorn, A.D. (2006). Extraction of plant secondary metabolites, in: Sarker, S.D., Latif, Z. dan Gray, A.I., eds. *Naturals Products Isolation*. 2<sup>nd</sup> Ed. *New jersey*: Humana Press.
- Mandal, S. et. al. (2009). Antioxidants: a review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 1(1): 102-104.
- Maryam et. al. (2015). Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera Lam.*) Menggunakan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 2 No.2.
- Molyneux P. (2004). The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *Songklanakar J. Sci. Technol.* 26 (2): 211-219.
- Muthmainnah. (2017). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica granatum L.*) dengan Metode Uji Warna, *Media Farmasi*, 13 (2), 23–28.
- Nurhayati, T, D. Aryanti, dan Nurjanah. 2009. Kajian Awal Potensi Ekstrak Spons Sebagai Antioksidan. *Jurnal Kelautan Nasional*. 2(2): 43-51.
- Ostertagova and Oskar. (2013). Methodology and Application of One-way ANOVA. *American Journal of Mechanical Engineering*, 2013, Vol. 1, No. 7, 256-261.
- Prakash A. (2001). Antioxidant Activity, Medallion Laboratories: *Analytical Progress*, 19 (2): 1-4.
- Purwanto, D., dkk. (2017). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Purnawija (*Kopsia arborea Blume.*) dengan Berbagai Pelarut. *Kovalen*, 3(1): 24 – 32.
- Puspa O.E., Syahbanu I. and Wibowo M.A. (2017). Uji Fitokimia dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans Houtt*) Dari Pulau Lemukutan, *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6 (2), 1–6.
- Puspitasari, Endah dan Indah Y. N. (2016). Kapasitas Antioksidan Ekstrak Buah Salak (*Salacca zalacca (Gaertn.) Voss*) Varian Gula Pasir Menggunakan Metode Penangkapan Radikal Bebas, *Pharmacy*, Vol. 13, No. 1, ISSN 1693-3591.
- Raharjo, Sahid. (2023). Cara Melakukan Analisis Anova Satu Faktor dengan SPSS, *Article SPSS Indonesia*, <https://www.spssindonesia.com/2017/10/analisis-anova-satu-faktor-spss.html> diakses pada Minggu, 13 Maret 2023, pukul 00.24.
- Rahayu, Supiani et. al. (2021). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*) dari Kabupaten Lombok Utara dan Wonosobo Menggunakan Metode FRAP. *Journal of Research in Pharmacy*, vol 1(2): 1-9, e-ISSN: 2774-9967.
- Robins. (2007). *Buku Ajar Patologi*. Vol. 1, Edisi 7. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Sami et. al. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea L. var. Italica*) dengan Metode DPPH (*2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl*) dan Metode ABTS (*2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat*), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, Vol. 2, No. 2.
- Sandhya, S. et. al. (2010). An Updated Review on The Genus Glochidion Plant. India: Scholars Research Library. *Archives of Applied Science Research*, 2(2): 309-322. ISSN 0975-508X.
- Shahidi F., et al. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: antioxidant activity and health effects - a review. *J Funct Foods*, 18, 820-897.
- Susanti et. al. (2012). Polaritas Pelarut sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza sativa glatinosa*), *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS*, ISSN: 1412-9612.
- Pridatama, Yolanda. (2021). Studi Komparatif Metode DPPH dan FRAP Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Telur Keong Mas (*Pomaceae cannaliculata*), *Jurnal Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Riau Pekanbaru*.
- Purwaningsih, Sri. (2012). Aktivitas Antioksidan dan Komposisi Kimia Keong Matah Merah (*Cerithidea obtusa*), *ILMU KELAUTAN*. Vol. 17 (1) 39-48