

Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP

Finna Setiawan, Oeke Yunita dan Ade Kurniawan

Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya

Korespondensi: Finna Setiawan

Email: finna@staff.ubaya.ac.id

Submitted: 01-11-2018, Revised: 03-12-2018, Accepted: 19-12-2018

ABSTRAK: Perbedaan letak geografis suatu tanaman dapat menyebabkan perbedaan pada kandungan kimianya. Kandungan kimia yang berbeda dapat menyebabkan perbedaan aktivitas farmakologi tanaman, salah satunya adalah aktivitas antioksidan. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan berbagai pengujian antioksidan terhadap secang yang berasal dari beberapa lokasi baik di luar negeri maupun Indonesia. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan*) yang berasal dari B2P2TOOT Tawangmangu. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah soxhletasi dengan pelarut etanol 80%. Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol kayu secang. Ekstrak tersebut menunjukkan hasil positif pada golongan glikosida flavonoid, flavonoid bebas, alkaloid, dan polifenol. Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH, ABTS, dan FRAP. Trolox digunakan sebagai standar pembanding untuk menunjukkan aktivitas antioksidan. Hasil pengujian aktivitas ekstrak etanol kayu secang dan trolox menunjukkan nilai IC_{50} masing-masing sebagai berikut: 101,47 dan 76,15 ppm (DPPH); 26,70 dan 19,38 ppm (ABTS); 11,37 dan 11,04 ppm (FRAP). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki daya antioksidan yang kuat. Polifenol dan flavonoid diduga memiliki peranan penting pada aktivitas antioksidan kayu secang.

Kata kunci: Antioksidan; Kayu Secang; *Caesalpinia sappan*; DPPH; FRAP; ABTS

ABSTRACT: Difference of geographical location may influence the chemical components of plants. The differences in chemical compounds then cause different effectivity and safety of same plants from different locations. In previous studies, antioxidant assay was conducted on secang (*Caesalpinia sappan*) from various locations in the world including from Indonesia. This recent study aims to determine the antioxidant activity of the ethanol extract of secang wood from B2P2TOOT, Tawangmangu. The extraction was carried out by soxhletation method using 80% ethanol as extraction solvent. Phytochemical screening was done to determine the chemical compound(s) of the extract. Antioxidant activity was evaluated by DPPH, ABTS, and FRAP methods. Trolox was used as standard antioxidant compound. The result showed IC_{50} of extract and trolox were 101.47 and 76.15 ppm (by DPPH method); 26.70 and 19.38 ppm (by ABTS method); 11.37 and 11.04 ppm (by FRAP method), respectively. From this research can be concluded that etaholic extract of secang has strong antioxidant activity. Polyphenols and flavonoids were considered as the active compounds for this activity.

Keywords: Antioxidant; Secang Woods; *Caesalpinia sappan*; DPPH; ABTS; FRAP

1. Pendahuluan

Radikal bebas adalah molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan [1]. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul sekitar untuk memperoleh pasangan elektron untuk mencapai kestabilan molekul. Reaksi berlangsung terus menerus dalam tubuh dan apabila tidak dihentikan akan mengakibatkan timbulnya penyakit seperti kanker, katarak, penuaan dini, jantung serta penyakit degeneratif lainnya. Senyawa yang diperlukan untuk menetralkan dan juga dapat mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas adalah antioksidan. Antioksidan dapat melengkapi kekurangan elektron yang dibutuhkan oleh radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas [2].

Salah satu tanaman obat yang memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi adalah secang (*Caesalpinia sappan* L.). Menurut Lim *et al.* (1997) dan Bae *et al.* (2005), zat warna merah yang terkandung dalam secang dikenal sebagai senyawa golongan brazilin, dimana brazilin merupakan senyawa antioksidan yang mempunyai katekol dalam struktur kimianya dan dapat melindungi tubuh dari keracunan akibat radikal bebas [3,4].

Identifikasi aktivitas antioksidan ekstrak air tanaman secang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya, dimana ekstrak tersebut memiliki nilai IC_{50} sebesar 15,69 ppm dengan metode DPPH [5]. Pada penelitian dengan menggunakan metode ABTS, ekstrak memiliki nilai IC_{50} sebesar 10,24 ppm [6]. Berdasarkan data penelitian yang diperoleh, maka ekstrak tanaman secang termasuk antioksidan yang sangat kuat. Blois (1958) menyatakan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm [5,7].

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol kayu secang (Sappan Lignum) yang berasal dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

Adanya perbedaan letak geografis dapat menyebabkan perbedaan pada kandungan kimia dalam tanaman. Kondisi ini dapat mempengaruhi aktivitas farmakologi dari tanaman. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt), dan FRAP (*ferric reducing antioxidant power*). Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan kimia dari ekstrak etanol kayu secang. Dalam penelitian ini diharapkan dapat menentukan aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang yang berasal dari B2P2TOOT, Tawangmangu dimana kayu secang merupakan salah satu komponen dalam ramuan jamu saintifik yang mana hingga saat ini mayoritas masih berasal dari B2P2TOOT Tawangmangu.

2. Metode dan Bahan

2.1. Bahan dan Alat

Bahan penelitian yang digunakan meliputi kayu secang yang berasal dari B2P2TOOT Tawangmangu, sodium hidroksida (Merck), asam galat 98% (MP Biomedicals), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl atau DPPH (Sigma Aldrich), 2,4,6-tripyridyl-s-triazine atau TPTZ (Sigma Aldrich), ABTS (Sigma Aldrich), trolox (Sigma Aldrich), aluminium klorida (Merck), reagen *Folin-Ciocalteu* (Sigma Aldrich), natrium karbonat (Merck), natrium asetat anhidrat (Merck), asam asetat (Merck), ferri klorida (Merck), etanol 80%, dan aquadem.

Alat yang digunakan terdiri dari spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu), Microplate Reader (FLUOstar® Omega), pipet mikro (Socorex), *micropipette tip* (biru dan kuning), botol gelap, dan alat-alat gelas laboratorium.

2.2. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap golongan glikosida flavonoid, flavonoid bebas, alkaloid, polifenol, tanin, saponin, dan minyak atsiri menggunakan uji spot dengan reaksi warna.

2.3. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Prosedur pengujian dilakukan berdasarkan Blois (1958). Dibuat beberapa larutan sampel dengan konsentrasi 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200 ppm dan trolox dengan konsentrasi 20,40,60,80, dan 100 ppm. Sampel dipipet dan ditambahkan larutan DPPH (200 ppm) dengan perbandingan 1:4 ke dalam 96-well clear polystyrene microplate lalu dihomogenkan. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C, kemudian serapan diukur dengan microplate reader pada panjang gelombang 520 nm. Trolox sebagai kontrol positif diperlakukan sama dengan sampel [7].

2.4. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS

2.4.1. Pembuatan Larutan ABTS

Ditimbang serbuk ABTS 7,100 mg dan serbuk kalium persulfat 3,500 mg, kemudian masing-masing dilarutkan dalam 5 mL etanol. Larutan diinkubasi selama 12 jam dalam ruangan gelap. Larutan keduanya dicampur, kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol sampai 25 mL.

2.4.2. Pengukuran aktivitas antioksidan

Prosedur pengujian dilakukan berdasarkan Arnao (2000). Dibuat beberapa larutan sampel dengan konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Trolox disiapkan dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Larutan ABTS dan sampel dipipet dengan perbandingan 1:1 ke dalam 96-well clear polystyrene microplate kemudian dihomogenkan. Campuran lalu diukur serapannya dengan microplate reader pada panjang gelombang 520 nm. Trolox sebagai kontrol positif diperlakukan sama dengan sampel [8].

2.5. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

2.5.1. Pembuatan larutan FRAP

Ditimbang natrium asetat trihidrat, TPTZ, dan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ masing-masing sebanyak 187, 150, dan 270 mg. Natrium asetat trihidrat ditambahkan asam asetat 16 mL dan dilarutkan dengan

aquadem hingga tepat 250,0 mL. Serbuk TPTZ dilarutkan dalam HCl 40 mM hingga tepat 50,0 mL. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan aquadem hingga tepat 100,0 mL. Ketiga larutan tersebut dicampur dengan cara menambahkan larutan natrium asetat trihidrat 25 mL, larutan TPTZ 2,5 mL, dan larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mL, lalu ditambahkan aquadem hingga tepat 100,0 mL dalam labu ukur.

2.5.2. Pengukuran aktivitas antioksidan

Prosedur pengujian aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan Benzie dan Strain (1996). Dibuat larutan sampel dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 ppm. Trolox disiapkan dengan konsentrasi 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Larutan FRAP dan sampel dipipet dengan perbandingan 1:3 ke dalam 96-well clear polystyrene microplate kemudian dihomogenkan dan didiamkan selama 10 menit pada suhu 37°C, lalu diamati absorbansinya pada panjang gelombang 594 nm. Trolox diperlakukan sama dengan sampel dan dijadikan sebagai kontrol positif [9].

2.6. Analisis data

Dari hasil perhitungan masing-masing metode pengujian antioksidan didapatkan % kapasitas peredaman. Dibuat kurva konsentrasi (ppm) terhadap % kapasitas peredaman, kemudian didapat persamaan regresi $y = a + bx$. Nilai IC_{50} dihitung untuk menentukan berapa konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk memiliki 50% kapasitas peredaman.

3. Hasil dan Diskusi

3.1. Skrining Fitokimia

Hasil skrining fitokimia (Tabel 1) menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki kandungan glikosida flavonoid, flavonoid bebas, alkaloid, dan polifenol. Polifenol dan flavonoid merupakan golongan senyawa yang diduga memiliki peranan pada aktivitas antioksidan dari secang [10].

Tabel 1. Tabel hasil skrining fitokimia ekstrak etanol kayu secang

No	Kandungan Golongan Kimia	Hasil
1	Glikosida flavonoid	+
2	Flavonoid bebas	+
3	Alkaloid	+
4	Polifenol	+
5	Tanin	-
6	Saponin	-
7	Minyak atsiri	-

3.2. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

Prinsip kerja metode DPPH adalah adanya atom hidrogen dari senyawa antioksidan yang berikatan dengan elektron bebas pada senyawa radikal sehingga menyebabkan perubahan dari radikal bebas (*diphenylpicrylhydrazyl*) menjadi senyawa non-radikal (*diphenylpicrylhydrazine*). Hal ini ditandai dengan perubahan warna dari ungu menjadi kuning (senyawa radikal bebas tereduksi oleh adanya antioksidan) [11].

Pada penetapan aktivitas antioksidan dengan metode DPPH digunakan parameter IC_{50} yaitu konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50%. Tabel 2 menunjukkan hasil pengujian antioksidan meng-

gunakan metode DPPH dengan nilai IC_{50} untuk ekstrak etanol kayu secang 101,8 ppm (Gambar 1) dan trolox 76,19 ppm (Gambar 2), dimana semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin kuat [11]. Pada pengujian antioksidan menggunakan metode DPPH ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas antioksidan kuat dengan nilai IC_{50} mendekati trolox sebagai pembandingnya.

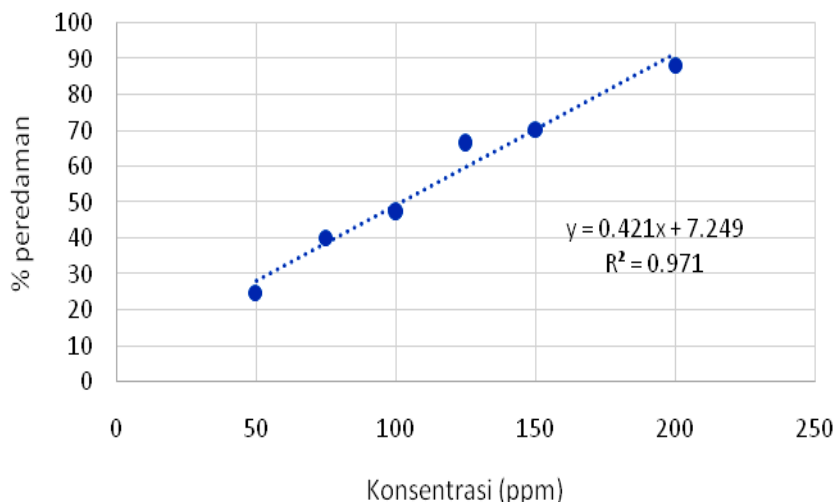
3.3. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS

Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS adalah penghilangan warna kation ABTS untuk mengukur kapasitas antioksidan yang langsung bereaksi dengan radikal kation ABTS. ABTS adalah suatu radikal dengan pusat nitrogen yang mempunyai karakteristik warna biru-hijau, yang bila tereduksi oleh antioksidan akan berubah menjadi bentuk non radikal dari berwarna menjadi tidak berwarna. Metode ABTS sangat sensitif terhadap cahaya, bahkan pembentukan $ABTS^{\bullet-}$ memerlukan waktu inkubasi selama 12-16 jam dalam kondisi gelap.

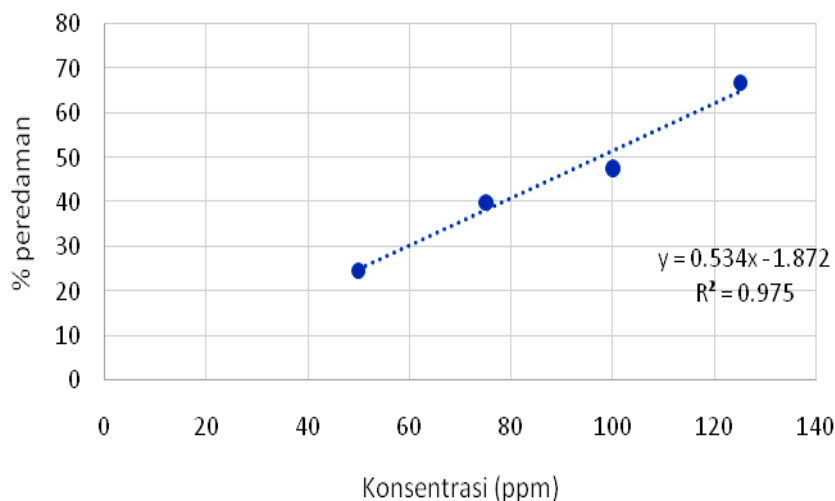
Tabel 3 menunjukkan hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS, dimana ekstrak etanol kayu secang memiliki nilai IC_{50}

Tabel 2. Hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode DPPH

No.	Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Peredaman \pm SD
1	Ekstrak etanol kayu secang	25	12,76 \pm 0,0223
		50	24,86 \pm 0,0135
		75	40,16 \pm 0,0014
		100	47,68 \pm 0,0308
		125	66,89 \pm 0,0389
		150	70,50 \pm 0,0523
		200	88,34 \pm 0,0064
$IC_{50} = 101,8$ ppm			
2	Trolox	20	12,63 \pm 0,0398
		40	24,03 \pm 0,0250
		60	40,69 \pm 0,0192
		80	52,57 \pm 0,0235
		100	65,62 \pm 0,0324
$IC_{50} = 76,19$ ppm			



Gambar 1. Kurva hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode DPPH



Gambar 2. Kurva hasil pengujian antioksidan trolox menggunakan metode DPPH

Tabel 3. Hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode ABTS

No.	Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Peredaman ± SD
1	Ekstrak etanol kayu secang	10	22,17 ± 0,0241
		20	38,24 ± 0,0040
		30	57,92 ± 0,0105
		40	72,71 ± 0,0155
		50	88,58 ± 0,0154
			IC₅₀ = 26,70 ppm
2	Trolox	5	16,37 ± 0,0320
		10	31,31 ± 0,0153
		15	36,49 ± 0,0201
		20	53,01 ± 0,0240
		25	62,74 ± 0,0113
			IC₅₀ = 19,38 ppm

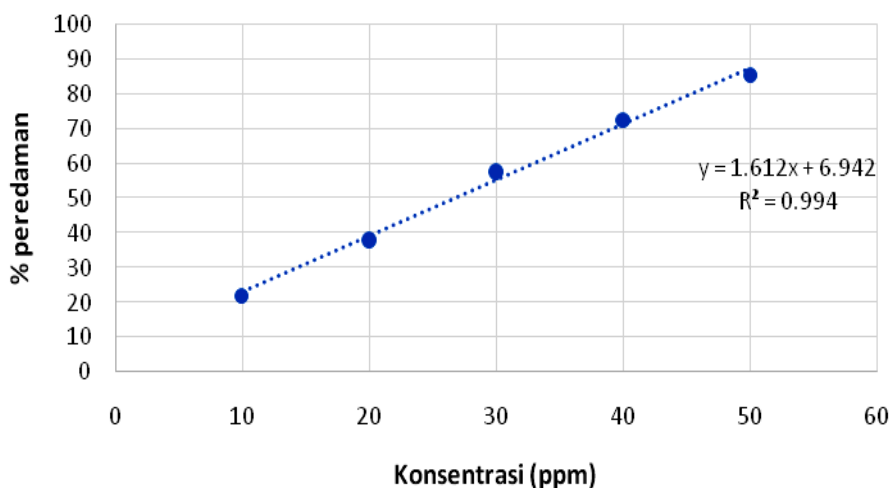
sebesar 26,70 ppm (Gambar 3), sedangkan trolox menunjukkan nilai IC_{50} 19,38 ppm (Gambar 4). Pada pengujian antioksidan menggunakan metode ABTS ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas sangat kuat dengan nilai IC_{50} mendekati trolox sebagai pembandingnya yaitu kurang dari 50 ppm.

3.4. Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP

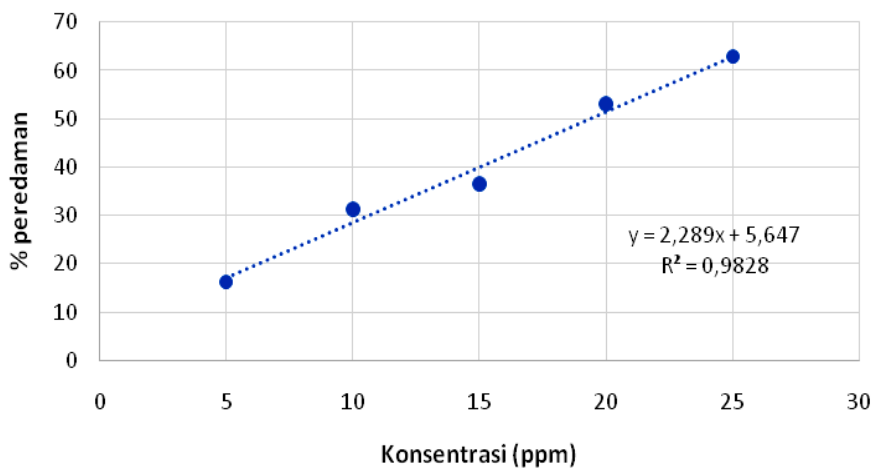
Penetapan aktivitas antioksidan menggunakan metode FRAP pada prinsipnya dapat berjalan dengan baik jika dilakukan pada senyawa antioksidan yang dapat mereduksi *ferri-tripyridyl-triazine* (Fe(III)TPTZ) menjadi kompleks

ferro-tripyridyl-triazine (Fe(II)TPTZ) [12]. Tabel 4 menunjukkan hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode FRAP dengan nilai IC_{50} 11,37 ppm (Gambar 5) dan IC_{50} trolox adalah 11,04 ppm (Gambar 6). Pada pengujian antioksidan menggunakan metode FRAP ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC_{50} mendekati trolox sebagai pembandingnya yaitu kurang dari 50 ppm.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH, ABTS, dan FRAP menunjukkan hasil bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas yang kuat. Blois



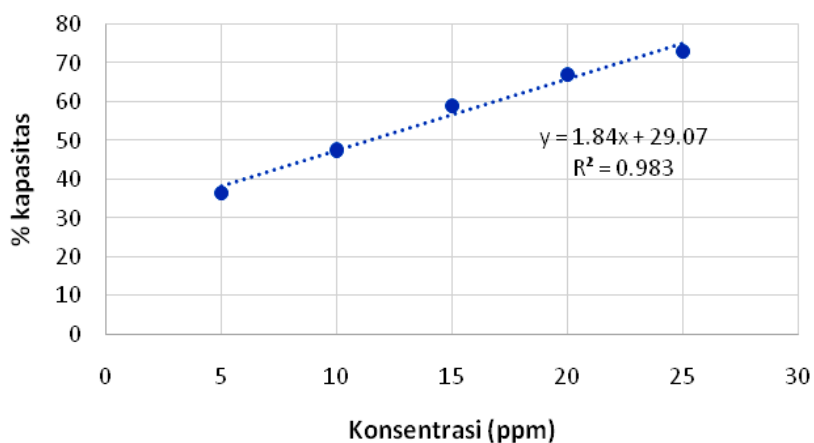
Gambar 3. Kurva hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode ABTS



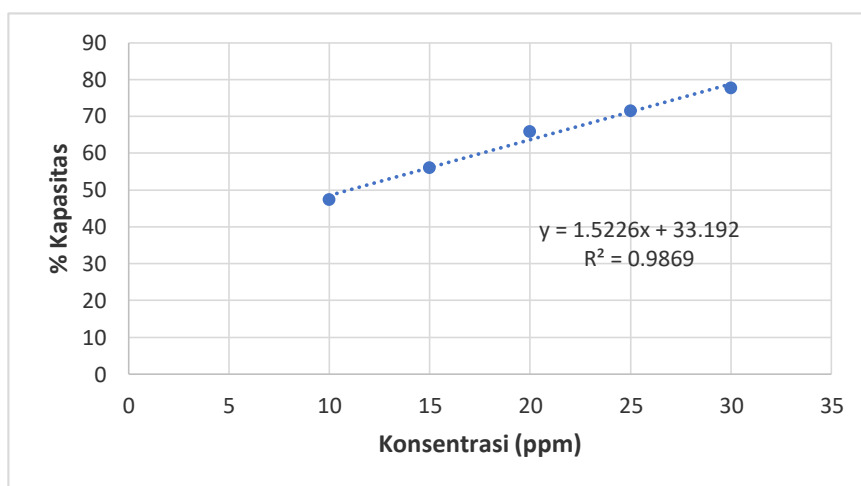
Gambar 4. Kurva hasil pengujian antioksidan trolox menggunakan metode ABTS

Tabel 4. Hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode FRAP

No.	Sampel	Konsentrasi (ppm)	% Kapasitas ± SD
1	Ekstrak etanol kayu secang	5	36,50 ± 0,0081
		10	47,60 ± 0,0080
		15	59,03 ± 0,0065
		20	67,12 ± 0,0061
		25	72,92 ± 0,0081
IC₅₀ = 11,37 ppm			
2	Trolox	10	47,28 ± 0,0020
		15	56,05 ± 0,0007
		20	65,80 ± 0,0005
		25	71,49 ± 0,0130
		30	77,61 ± 0,0100
IC₅₀ = 11,04 ppm			



Gambar 5. Kurva hasil pengujian antioksidan ekstrak etanol kayu secang menggunakan metode FRAP



Gambar 6. Kurva hasil pengujian antioksidan trolox menggunakan metode FRAP

(1958) menyatakan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika memiliki nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm [5,7]. Hal ini dapat dilihat dari besarnya nilai IC_{50} dari masing-masing pengujian dan dapat juga dilihat perbandingan nilai IC_{50} dengan trolox. Trolox merupakan antioksidan yang dapat larut dalam air, yang merupakan hasil sintesis sebagai derivat Vitamin E pada 1974. Trolox juga banyak digunakan sebagai standard pembanding dalam berbagai pengujian antioksidan.

4. Kesimpulan

Ekstrak etanol kayu secang memiliki aktivitas antioksidan kuat. Polifenol dan flavonoid diduga memiliki peranan penting dalam aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang.

Ucapan Terimakasih

Penelitian ini didanai oleh Hibah Riset Unggulan yang diberikan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Universitas Surabaya dengan No. kontrak 101/SP-LIT/LPPM-01/INT/FF/XI/2017.

Daftar Pustaka

1. Silalahi J. Makanan Fungsional. Yogyakarta: Kanisius; 2006.
2. Prakash A. Antioxidant Activity. *Analytical Progress*. 2001;19(2):1-4.
3. Bae IK, Min HY, Han AR, Han EK, Seo S. Lee. Suppression of Lipopolysaccharide-induced of Inducible Nitric Oxide Synthase by Brazilin in RAE 264.7 Macrophage Cells. *European Journal of Pharmacology*. 2005;513:237-42.
4. Lim DK, Choi U, Shin DH. Antioxidative Activity of Some Solvent Extract from *Caesalpinia sappan* L. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 1996;28(1):77-82.
5. Utari FD, Sumirat S, Djaeni M. Produksi Antioksidan dari Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) Menggunakan Pengereng Berkelembaban Rendah. *Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan*. 2017;6(3):1-4.
6. Wetwitayaklung P, Phaechamud T, Keokitichai S. The antioxidant activity of *Caesalpinia sappan* L. heartwood in various ages. *Naresuan University Journal*. 2005;13(2):43-52.
7. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181(4617):1199.
8. Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. 2000;11(11):419-21.
9. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*. 1996;239(1):70-6.
10. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2009;2(5):270-8.
11. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. 2004;26(2):211-9.
12. Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Deemer EK. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002;50(11):3122-8.