

Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Eka Prasasti Nur Rachmani dan Tuti Sri Suhesti

Departemen Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman

Korespondensi: Eka Prasasti Nur Rachmani

Email: ekasholehah@yahoo.com

ABSTRAK: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan herba *Andrographis paniculata* (sambiloto). Aktivitas antioksidan ekstrak air herba sambiloto dan fraksi-fraksinya diuji dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl). Dari hasil penelitian diketahui bahwa IC_{50} ekstrak air, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan residu ekstrak herba sambiloto berturut-turut adalah 1036,761; 820,15; 395,01; dan 1080,60 $\mu\text{g/ml}$. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid.

Kata kunci: antioksidan; *Andrographis paniculata*; DPPH; flavonoid

ABSTRACT: This study was conducted to identify the antioxidant properties of *Andrographis paniculata* herbs. Its water extract and fractions were tested for antioxidant activity using DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) scavenging method. Antioxidant property was stated with IC_{50} value. IC_{50} values of water extract from *A. paniculata* herb, their fractions of chloroform, ethyl acetate and residue were 1036.76; 820.15; 395.01; and 1080.60 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The phytochemical screening showed the presence of flavonoids.

Keywords: antioxidant; *Andrographis paniculata*; DPPH; flavonoids

1. Pendahuluan

Antioksidan merupakan molekul yang mampu memperlambat atau mencegah proses oksidasi molekul lain. Radikal bebas sebagai molekul yang relatif tidak stabil, memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbital luarnya. Molekul tersebut bersifat reaktif dalam mencari pasangan elektronnya. Hal ini dapat menghasilkan radikal bebas, sehingga memicu reaksi berantai yang dapat merusak sel.

Salah satu tanaman obat yang secara empiris telah digunakan sebagai obat adalah sambiloto (*Andrographis paniculata*). Beberapa khasiat sambiloto antara lain untuk menyembuhkan gatal-gatal, keputihan, sebagai antipiretik, dan diuretik serta mengobati beberapa penyakit degeneratif seperti diabetes, tekanan darah tinggi dan reumatik. Penyakit degeneratif meningkat disebabkan karena adanya perubahan gaya hidup dan pola makan sehingga dapat menimbulkan radikal bebas yang berdampak pada kerusakan sel.

Sambiloto memiliki kandungan senyawa andrografolid dan flavonoid. Andrografolid merupakan senyawa diterpen yang telah banyak diteliti dan memiliki aktivitas farmakologi. Flavonoid dalam herba sambiloto memiliki gugus polihidroksi dan polimetoksi [1-3].

Penelitian ini dilakukan untuk mengungkapkan secara ilmiah pemakaian herba sambiloto sebagai obat tradisional yang telah digunakan secara turun temurun dengan menguji aktivitas antioksidannya, yang selanjutnya diharapkan dapat diaplikasikan dalam pengobatan modern oleh bidang ilmu terkait. Saat ini banyak diproduksi makanan kesehatan baik berupa pil, kapsul dan suplemen yang mengandung antioksidan. Makanan kesehatan mempunyai pangsa yang besar bahkan telah menjadi gaya hidup. Oleh karena itu, penemuan dan pengembangan bahan antioksidan dari sumber daya hayati sangat penting, mengingat antioksidan dapat diaplikasikan sebagai bahan obat, makanan, dan kosmetik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak air dan fraksinya dari herba

sambiloto serta mengidentifikasi senyawa yang terkandung di dalamnya.

2. Metode

2.1. Bahan penelitian

Bahan tanaman yang digunakan adalah herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang diperoleh dari daerah Kulon Progo, Yogyakarta, yang diambil pada bulan maret 2016. Pelarut dan bahan kimia yang digunakan antara lain 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hidrat (DPPH, Sigma), aquades, kloroform, etil asetat, FeCl₃, NaOH, silika gel 60 F 254, dan asam asetat glasial (E'Merck).

2.2. Cara kerja

2.2.1. Penyiapan bahan

Tanaman sambiloto yang berumur 3-4 bulan dipanen. Bagian tanaman yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun dan batang. Herba yang sudah dikumpulkan kemudian disortasi dan dicuci dengan air mengalir. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan kotoran berupa tanah atau kotoran lain yang menempel pada herba sambiloto. Herba sambiloto yang sudah dicuci kemudian dikeringkan dalam oven suhu 50-60°C sampai kering ditandai dengan herba sambiloto dapat remuk saat diremas. Sebelum diekstraksi, herba sambiloto yang sudah dikeringkan dibuat serbuk dengan menggunakan *grinder* untuk memperbesar luas permukaan bahan.

2.2.2. Ekstraksi dan fraksinasi

Sebanyak 500g simplisia sambiloto ditimbang kemudian diekstraksi dengan metode dekokta, yaitu dengan mendidihkan simplisia selama 30 menit. Waktu dihitung setelah suhu mencapai 90°C. Filtrat hasil dekokta kemudian diuapkan menggunakan cawan porselen di atas penangas air sehingga diperoleh ekstrak kental herba sambiloto.

Ekstrak kental herba sambiloto kemudian dipartisi berturut-turut dengan menggunakan kloroform dan etil asetat. Ekstrak kental herba sambiloto yang masih berupa cairan, ditambah

kloroform kemudian digojog selama 15 menit. Setelah terbentuk dua lapisan, lapisan kloroform (bagian bawah) dipisahkan. Partisi dengan kloroform dilakukan berulang sampai lapisan kloroform berwarna jernih. Filtrat kloroform kemudian dijadikan satu dan diuapkan hingga diperoleh fraksi kloroform. Partisi dilanjutkan dengan pelarut etil asetat. Partisi dilakukan dengan cara yang sama seperti partisi dengan menggunakan kloroform, maka akan diperoleh fraksi etil asetat. Residu yang tidak larut dalam kloroform dan etil asetat, selanjutnya diuapkan juga hingga diperoleh fraksi residu dekokta herba sambiloto. Ketiga fraksi tersebut yaitu fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan fraksi residu dekokta herba sambiloto, ditimbang, dan dihitung rendemennya.

2.2.3. Penetapan aktivitas antioksidan

Sebanyak 5,4 mg serbuk DPPH ditambahkan ke dalam 100 ml metanol untuk mendapatkan larutan DPPH 0,14 mM. Larutan DPPH harus dibuat baru. Larutan DPPH 600 µl ditambah dengan 400 µl etanol. Setelah 30 menit dibiarkan di tempat gelap, larutan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm dengan blanko metanol.

Operating time ditentukan berdasarkan waktu yang dibutuhkan antara ekstrak dan DPPH bereaksi secara optimal. Delapan tabung reaksi, masing-masing berisi 600 µl larutan DPPH 0,14 mM. Ditambahkan 2 ml ekstrak air herba sambiloto dengan konsentrasi 400 ppm. Setiap tabung reaksi diinkubasi di tempat gelap dengan waktu yang berbeda dalam waktu 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit, 25 menit, 30 menit, 35 menit, dan 40 menit, kemudian absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 516 nm dengan blanko metanol.

Ekstrak air herba sambiloto dibuat dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 20, 30, 40 dan 50 ppm. Setiap konsentrasi sampel diambil 2 ml dan ditambahkan 3 ml larutan DPPH. Sampel dihomogenkan, kemudian didiamkan selama 35 menit di tempat gelap, lalu absorbansi diukur. Pengukuran peredaman radikal bebas pada fraksi

kloroform, etil asetat dan residu dilakukan dengan cara yang sama. Persen peredaman diperoleh dari rata-rata nilai absorbansi masing-masing sampel, kemudian dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

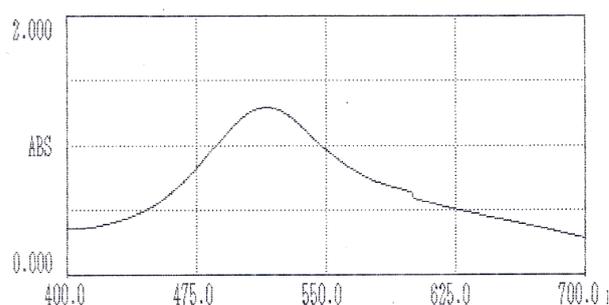
$$\% \text{ Peredaman} = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel uji}}{\text{Absorbansi pembanding}} \right) \times 100\%$$

2.2.4. Identifikasi senyawa dalam ekstrak sambiloto

Identifikasi kandungan kimia sambiloto dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Identifikasi dilakukan pada senyawa golongan flavonoid. KLT dilakukan dengan menggunakan fase diam silika gel dan selulosa. Fase gerak dipilih berdasarkan hasil kromatogram dengan pemisahan yang terbaik.

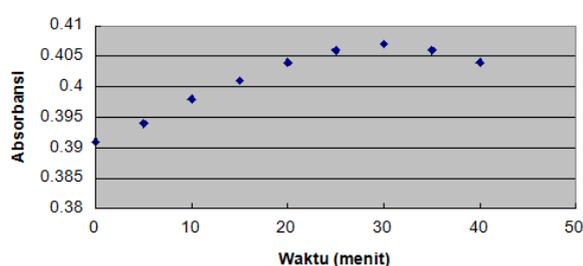
3. Hasil dan pembahasan

Aktivitas peredaman radikal bebas diukur dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini dipilih karena mudah, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel. Sebelum melakukan pengukuran absorbansi sampel, dilakukan terlebih dahulu pengukuran panjang gelombang maksimal DPPH. Panjang gelombang maksimum DPPH diperoleh pada 516 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimal dapat dilihat pada Gambar 1. Absorbansi dengan panjang gelombang 516 nm adalah 0,774, sehingga campuran sampel dan larutan DPPH diukur absorbansinya pada panjang gelombang 516 nm.



Gambar 1. Panjang gelombang maksimum DPPH dalam metanol

Hasil penentuan *operating time* (Gambar 2) menunjukkan bahwa waktu pengukuran yang stabil yaitu pada saat sampel bereaksi sempurna dengan reagen warna terjadi pada menit ke-30. Jadi pengukuran absorbansi sampel dilakukan pada menit ke-30. Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan larutan radikal DPPH dalam metanol sebagai blanko. Pengukuran dilakukan tiga kali pada awal menit ke-30. Pengukuran dilakukan pada ekstrak dekokta, fraksi kloroform, fraksi etil asetat dan residu pada beberapa konsentrasi yang berbeda.

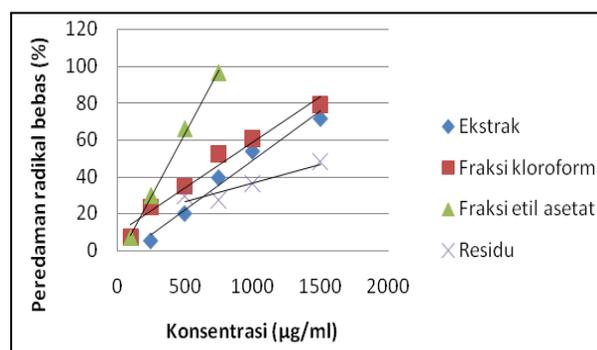


Gambar 2. Penentuan *operating time*

Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas dilakukan dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH. Peredaman tersebut dihasilkan oleh reaksi antara molekul 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul komponen sampel sehingga terbentuk senyawa 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning.

Dari data pengukuran nilai absorbansi pada menit ke-30 dapat dianalisis pengaruh konsen-

trasi sampel terhadap persentase peredaman, dimana peningkatan aktivitas peredaman radikal bebas sebanding dengan bertambahnya konsentrasi (Tabel 1). Selanjutnya ditentukan persamaan regresi konsentrasi vs peredaman, dan dari persamaan tersebut dihitung aktivitas 50%-nya, sehingga diperoleh nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ($\mu\text{g/ml}$) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} , berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan suatu bahan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, kuat untuk IC_{50} bernilai 50-100 ppm, sedang jika bernilai 100-150 ppm, dan lemah jika nilai IC_{50} bernilai 151-200 ppm.



Gambar 3. Aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Gambar 3 menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan persen peredaman radikal bebas dari ekstrak dan fraksi herba sambiloto. Pada gambar tersebut ditunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, nilai peredaman radikal bebas

Tabel 1. Aktivitas peredaman radikal bebas ekstrak air herba sambiloto dan fraksi-fraksinya

Konsentrasi sampel ($\mu\text{g/ml}$)	Peredaman radikal bebas DPPH (%)			
	Ekstrak air	Fraksi kloroform	Fraksi etil asetat	Residu
1500	71,74	79,21	-	48,09
1000	54,00	60,50	-	36,35
750	39,71	52,29	96,33	27,26
500	20,23	34,86	65,90	29,45
250	5,41	23,64	29,60	-
100	-	7,054	6,72	-

juga semakin tinggi. Pada residu dibutuhkan konsentrasi yang lebih besar untuk dapat meredam radikal bebas dibanding dengan ekstrak, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat, fraksi kloroform, ekstrak dan residu berturut-turut memiliki aktivitas peredaman yang semakin kecil. Dari Gambar 3 diperoleh persamaan regresi linear seperti yang terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai persamaan regresi linear dan korelasi relatif peredaman radikal bebas herba sambiloto

Sampel	Persamaan regresi	r
Ekstrak air	$y = 0,138x - 5,625$	0,998
Fraksi kloroform	$y = 0,049x + 8,801$	0,983
Fraksi etil asetat	$y = 0,054x - 5,012$	0,986
Residu	$y = 0,020x + 15,87$	0,943

Aktivitas antioksidan yang diukur dengan nilai IC_{50} dari peredaman radikal bebas (Tabel 3), diperoleh data bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas tertinggi, dengan nilai IC_{50} sebesar 402,50 $\mu\text{g/ml}$. Aktivitas antioksidan paling rendah yaitu pada residu dengan nilai IC_{50} 1648,74 $\mu\text{g/ml}$. Semakin rendah nilai IC_{50} berarti semakin kuat atau tinggi aktivitas suatu ekstrak atau fraksi dalam meredam radikal bebas.

Tabel 3. Aktivitas peredaman radikal bebas dari herba sambiloto

Sampel	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Ekstrak air	1018,75
Fraksi kloroform	825,63
Fraksi etil asetat	402,50
Residu	1648,74

DPPH adalah radikal bebas yang bersifat stabil, cepat dan sensitif untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari senyawa tertentu atau ekstrak suatu tanaman. DPPH dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen, karena adanya elektron yang tidak berpasangan.

DPPH memberikan serapan kuat pada 516 nm. Ketika elektronnya menjadi berpasangan oleh keberadaan penangkap radikal bebas, maka absorbansinya menurun secara stokiometri sesuai jumlah elektron yang diambil. Adanya senyawa antioksidan dapat mengubah warna larutan DPPH dari ungu menjadi kuning. Perubahan absorbansi akibat reaksi ini telah digunakan secara luas untuk menguji kemampuan beberapa molekul sebagai penangkap radikal bebas [4].

Penelitian yang dilakukan Saranya *et al.* [5] yaitu menguji aktivitas antioksidan isolat andrografolid dari ekstrak sambiloto dengan standar asam askorbat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan andrografolid menunjukkan nilai IC_{50} 6 $\mu\text{g/ml}$, tidak jauh berbeda dengan IC_{50} standar asam askorbat yaitu 5,0 $\mu\text{g/ml}$. Di dalam ekstrak dan fraksi dari herba sambiloto terdapat kandungan andrografolid. Aktivitas antioksidan dari herba sambiloto karena adanya kandungan flavonoid dan andrografolid. Penelitian lain yang dilakukan oleh Rais [6] menunjukkan bahwa ekstrak etanol sambiloto memiliki nilai IC_{50} sebesar 792,126 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan standar kuersetin memiliki nilai IC_{50} sebesar 3,403 $\mu\text{g/ml}$. Adanya kandungan flavonoid dan andrografolid pada herba sambiloto, menyebabkan herba sambiloto memiliki aktivitas antioksidan. Hal ini menunjukkan bahwa herba sambiloto memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai antioksidan.

Hasil identifikasi kandungan kimia dalam ekstrak dan fraksi herba sambiloto yang dilakukan dengan metode KLT dapat dilihat pada Gambar 4. Identifikasi dilakukan untuk menentukan adanya flavonoid dalam sampel. Dari Gambar 4 diketahui bahwa ekstrak air dan fraksi etil asetat menunjukkan adanya flavonoid, sedangkan fraksi kloroform dan residu tidak menunjukkan adanya flavonoid. Bercak pada ekstrak air jelas terdapat pada R_f 0,37, sedangkan bercak pada fraksi etil asetat terdapat pada R_f 0,35; 0,55; 0,62 dan 0,78.

Dari hasil penelitian di atas, terdapat korelasi positif antara aktivitas antioksidan dan hasil identifikasi flavonoid. Aktivitas antioksidan ter-



Gambar 4. Identifikasi flavonoid dengan KLT menggunakan fase diam selulosa dan fase gerak n-butanol-asam

besar dimiliki oleh fraksi etil asetat dan kandungan flavonoid teridentifikasi secara jelas. Bahkan pada fraksi etil asetat, flavonoid terdeteksi pada 4 bercak. Ini paling banyak di antara ekstrak dan fraksi lainnya.

4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat diambil kesimpulan bahwa herba sambiloto memiliki aktivitas antioksidan, dimana fraksi etil setat memiliki aktivitas tertinggi dengan nilai IC_{50} sebesar 402,50 $\mu\text{g/ml}$. Hasil penapisan fitokimia

menunjukkan bahwa fraksi etil asetat sambiloto mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid.

Daftar pustaka

1. Rao YK, Vimalamma G, Rao CV, Tzeng YM. Flavonoids and andrographolides from *Andrographis paniculata*. *Phytochemistry*. 2004; 65(16): 2317-21.
2. Chao WW, Lin BF. Review isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (Chuanxinlian). *Growth*. 2010;10: 44.
3. Hossain MS, Urbi Z, Sule A, Rahman KM. *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wall. ex Nees: A Review of ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-28.
4. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*. 2004;26 (2) : 211-9.
5. Saranya P, Geetha A, Narmadha Selvamathy SM. The antioxidant and $H^+ K^+$ ATPase inhibitory effect of *Andrographis paniculata* and andrographolide-in vitro and in vivo studies. *Pharmacologyonline*. 2010;1:356-76.
6. Rais IR. Aktivitas antioksidan ekstrak *Andrographis paniculata*, (burm.f.) Ness dengan dua perbedaan penguapan. *Pharmaciana*. 2016;6(1):95-100.