

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) Menggunakan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH

Asriani Suhaenah¹, A. Muflihunna¹, Dita Wulan Bahari*
¹Universitas Muslim Indonesia, Makassar, Sulawesi Selatan
*Corresponding author:
Universitas Muslim Indonesia, Makassar, Sulawesi Selatan
Email: 15020200092@umi.ac.id

ABSTRACT

Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) is a plant that contains secondary metabolite compounds namely flavonoids, alkaloids, terpenoids, saponins, tannins. This study aims to determine the antioxidant activity by DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging method. Samples were extracted by maceration method using 96% ethanol solvent. The ethanol extract of bitti leaves was quantitatively tested using concentrations of 25 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm and the absorbance was measured with a UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 510 nm and quercetin was measured as a comparison using concentrations of 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm. The results showed the presence of antioxidant activity with an IC₅₀ value of 56.59 µg/mL with a strong antioxidant activity category, while quercetin as a comparison had very strong antioxidant activity with an IC₅₀ value of 5.93 µg/mL.

Keywords: Bitti leaf extract (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume); Antioxidant; DPPH; UV-Vis spectrophotometer.

ABSTRAK

Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) merupakan tanaman yang mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin, tannin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil). Sampel diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak etanol daun bitti dilakukan pengujian kuantitatif dengan menggunakan konsentrasi 25 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 200 ppm dan absorbansinya diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm dan kuersetin diukur sebagai pembanding menggunakan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm. Hasil penelitian ekstrak etanol daun bitti menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 56,59 µg/mL dengan kategori aktivitas antioksidan kuat, sedangkan kuersetin sebagai pembanding memiliki aktivitas antioksidan sangat kuat dengan nilai IC₅₀ 5,93 µg/mL .

Kata Kunci: Ekstrak Daun Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume), antioksidan, DPPH, Spektrofotometer UV-Vis

PENDAHULUAN

Genus *Vitex* termasuk dalam famili *Lamiaceae* dan tersebar di seluruh dunia. Genus ini telah digunakan sebagai obat tradisional di Asia dan Eropa untuk mengobati gangguan hormon pada wanita, sakit kepala, diare dan penyakit lainnya. Namun, dari lebih dari 250 spesies *Vitex*, hanya 24 spesies yang telah diteliti komposisi botaninya. Berdasarkan studi literatur yang dilakukan hingga tahun 2013. Terpen, flavonoid dan lignan merupakan unsur utama yang diisolasi dari spesies *Vitex*. Bitti (*Vitex cofassus* Reinw.ex. Blume) ditemukan berbagai aktivitas farmakologi, antara lain hepatoprotektif, antitumor, antibakteri, antiinflamasi, antituberkulosis. Meskipun farmakotoksikologi pada ekstrak kasar kulit kayunya dilakukan pada tahun 1969, ditemukan bahwa ekstrak tanaman ini bermanfaat sebagai aktivitas penghambatan pertumbuhan di beberapa lini sel tumor manusia [1].

Radikal bebas dapat didefinisikan sebagai atom, molekul yang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan. Kehadiran elektron yang tidak berpasangan dapat membuat suatu senyawa atau molekul menjadi lebih reaktif dengan cara mengikat elektron-elektron molekul disekitarnya untuk mencari pasangan. Ketika elektron berikatan dengan senyawa radikal bebas yang bersifat ionik, efek samping yang timbulkan lebih kecil. Namun, jika elektron berikatan dengan radikal bebas yang berikatan kovalen dapat menimbulkan efek yang sangat berbahaya [2].

Antioksidan adalah suatu zat yang berperan dalam proteksi sel dan jaringan yang rusak akibat radikal bebas. Antioksidan ini bekerja dengan menghambat pembentukan dan aktivitas oksigen reaktif yang dapat merusak berbagai komponen tubuh seperti DNA, lemak, karbohidrat, dan protein [3].

Dalam penelitian ini, sampel yang akan digunakan yaitu daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) yang diperoleh dari daerah di Sulawesi Selatan, yaitu Tana Toraja. Hasil penelitian mengindikasikan adanya aktivitas antioksidan yang mempengaruhi kandungan metabolit sekunder [4].

Berdasarkan uraian tersebut, maka telah dilakukan penelitian uji aktivitas antioksidan dari tanaman daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) sehingga dapat memberikan manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan dan bidang kesehatan.

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia. Populasi pada penelitian ini adalah tumbuhan bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) dan sampel yang digunakan adalah daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) yang diperoleh dari daerah Makale, Tana Toraja.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas (*Pyrex*), seperangkat alat maserasi, seperangkat alat *rotary vacuum evaporator* (Ika® *RV basic*), spektrofotometri UV-Vis (tipe avolution 201), timbangan analitik (Carat series®), mikropipet (Huawei), dan vortex (IKA Vortex 3). Bahan yang digunakan yaitu, ekstrak daun bitti (*Vitex cofassus* reinw), etanol 96% ,kuersetin, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), aluminium foil, tissue, aquades.

Pengolahan Sampel

Daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) diperoleh dari Makale, Tana Toraja. Daun tersebut disortasi basah dan kering, lalu dibuat simplisia kering. Kemudian dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96%.

Pembuatan Ekstrak

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, sampel kering ditimbang sebanyak 50 gram, lalu masukkan ke dalam bejana maserasi kemudian direndam dengan etanol 96% selama 3 x 24 jam dan sesekali dilakukan pengadukan, simpan di tempat yang terlindung sinar matahari langsung, setelah itu dilakukan remaserasi selama 1 x 24 jam untuk memisahkan cairan dan residu kemudian diuapkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental [5].

Analisis Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bitti

Pembuatan Larutan DPPH

Larutan DPPH ppm dibuat dengan cara ditimbang sebanyak 5 mg serbuk DPPH kemudian dilarutkan dengan 25 mL etanol 96% dalam labu tentukur menghasilkan konsentrasi 200 pmm. Konsentrasi 50 ppm dibuat dengan cara memipet 6,25 mL dari stok DPPH 200 ppm, kemudian dicukupkan volumenya hingga 25 mL dan diukur di spektrofotometer UV-Vis

Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Larutan pembanding kuersetin 1000 ppm dibuat dengan cara ditimbang 10 mg kuersetin kemudian dilarutkan dengan etanol 96% dalam labu tentukur 10 mL, setelah itu dibuat konsentrasi 100 ppm dengan cara memipet 1 mL dari larutan stok 100 ppm lalu dicukupkan dengan labu tentukur 10 mL. kemudian dibuat beberapa variasi konsentrasi. Konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm dengan cara memipet 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL, 0,4 mL, 0,5 mL dan dicukupkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 5 mL dan diukur absorbansi di spektrofotometer UV-Vis.

Pembuatan Larutan Sampel Ekstrak Etanol Daun Bitti

Larutan stok 2000 ppm dibuat dengan cara menimbang ekstrak etanol daun bitti sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan etanol 96%, larutan dihomogenkan dan dicukupkan volumenya hingga 10 mL. kemudian dari larutan stok 2000 ppm selanjutnya dibuat pengenceran untuk lima variasi konsentrasi yaitu 25, 75, 100, 125, dan 200 ppm dengan cara memipet 0,0625 mL, 0,187 mL, 0,312 mL 0,25 mL, 0,5 mL dan dicukupkan dengan etanol 96% dalam labu ukur 5 mL dan diukur absorbansi di spektrofotometer UV-Vis.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pengujian dilakukan dengan mengukur larutan DPPH 50 ppm yang telah diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan diukur pada range panjang gelombang 400-800 nm, diperoleh panjang gelombang yaitu 510 nm.

Penentuan Aktivitas Antioksidan Baku Pembanding Kuersetin

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan pembanding kuersetin dari 5 variasi konsentrasi, kemudian masing-masing ditambahkan 3 mL DPPH 50 ppm. Campuran kemudian dihomogenkan dengan cara divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

Pengukuran Daya Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bitti

Pengujian dilakukan dengan memipet 1 mL larutan sampel dari berbagai konsentrasi, kemudian masing-masing ditambahkan 3 mL DPPH 50 ppm. Campuran kemudian dihomogenkan dengan cara divortex dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30

menit lalu absorbansinya diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

Analisis Data

Besarnya presentase inhibisi dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs DPPH}} \times 100\%$$

Nilai IC_{50} dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linear, konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Dari persamaan: $y = bx + a$ dapat dihitung nilai IC_{50} dengan menggunakan rumus : $IC_{50} = \frac{50-a}{b}$

Keterangan :

y = 50 (penghambat 50% oksidasi)

x = IC_{50} (bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%)

a = slope

b = intersept

HASIL DAN DISKUSI

Antioksidan adalah senyawa yang menghambat oksidasi molekul lain atau menetralkan radikal bebas. Tujuan umum dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Pada penelitian ini digunakan daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) untuk memberikan data secara ilmiah. Adapun metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi karena proses ekstraksi dengan maserasi tidak melibatkan pemanasan yang dapat mengakibatkan perubahan atau kerusakan pada senyawa atau komponen kimia dalam sampel [6].

Daun bitti merupakan tanaman endemik yang berasal dari Sulawesi Selatan. Beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder aktif yang ditemukan pada bitti, antara lain alkaloid, terpenoid, flavonoid, steroid, saponin dan tannin [7].

Pada penelitian ini digunakan ekstrak etanol daun bitti dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (*2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil*) Metode DPPH digunakan karena sederhana, mudah pengerjaannya, cepat dan hanya memerlukan sedikit sampel serta cocok untuk semua sampel yang memiliki kandungan senyawa antioksidan, dan metode DPPH ditemukan metode yang paling sesuai untuk aktivitas antioksidan karena menunjukkan hasil pengujian dengan reproduisible yang tinggi [8].

Hasil maserasi menghasilkan ekstrak yang berwarna hijau, hasil ekstrak tersebut diuapkan menggunakan rotary vacuum evaporator dengan bantuan pompa vakum untuk mempercepat penguapan pelarut. Persentase rendemen ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) sebesar 12,308% dari hasil ekstraksi. Rendemen ekstrak membantu mengetahui kadar metabolit sekunder yang dibawa pelarut, namun tidak memungkinkan untuk mengidentifikasi jenis senyawa yang terlarut secara spesifik. Hasil perhitungan persen rendemen ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Metode yang digunakan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) adalah metode DPPH (*2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil*) Metode DPPH digunakan karena kemampuannya dalam menangkap radikal bebas dalam pelarut organik seperti etanol dan untuk mengukur aktivitas penghambatan radikal bebas. Prinsip dasar pengujian antioksidan dengan menggunakan DPPH adalah senyawa antioksidan memberikan atom hidrogen kepada radikal bebas DPPH, yang mengubah warna larutan dari ungu menjadi kuning.

Persen inhibisi (% aktivitas antioksidan) merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas. Parameter yang digunakan untuk mengetahui besarnya kemampuan senyawa sebagai antioksidan yaitu nilai IC_{50} . Persen inhibisi meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi sampel dikarenakan semakin banyak senyawa pada sampel yang menghambat radikal bebas DPPH. Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi senyawa antioksidan yang dibutuhkan untuk menangkap radikal bebas DPPH sebanyak 50%. Nilai IC_{50} dapat diperoleh dari persamaan regresi linier yang menyatakan hubungan antara konsentrasi sampel sebagai sumbu (x) dengan % inhibisi sebagai sumbu (y). Konsentrasi sampel dihitung dengan nilai x yang diperoleh yaitu dengan cara memasukkan angka 50 sebagai y dalam persamaan regresi linier yang diperoleh dari grafik konsentrasi dengan % inhibisi [9].

Menurut Risasti Sinta suatu senyawa dinyatakan memiliki antioksidan menunjukkan aktivitas sangat kuat jika, $IC_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$, kuat jika $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$, sedang jika $IC_{50} 100-500 \mu\text{g/mL}$, dan lemah jika $IC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ [10].

Berdasarkan data hasil analisis larutan standar pembanding kuersetin dibuat kurva baku antara konsentrasi dan % inhibisi sehingga diperoleh linearitas $y = 2.5749x + 34.712$ dengan $R^2 = 0.9897$ dan nilai $r = 0.994$ (**Gambar 1**) **Tabel 2**. Sehingga nilai yang

diperoleh terdapat hubungan korelasi antara absorbansi dan konsentrasi larutan standar, Aktivitas antioksidan pembanding kuersetin diperoleh nilai $IC_{50} = 5,93 \mu\text{g/mL}$ yaitu tergolong sangat kuat [10]. daerah Hasil analisis dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Berdasarkan nilai IC_{50} yang diperoleh dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dibuat kurva baku antara konsentrasi dan absorbansi sehingga diperoleh linearitas $y = 0.1785x + 39.897$ dengan $R^2 = 0.9956$ dan nilai $r = 0.997$ (**Gambar 2**). dapat diketahui bahwa aktivitas antioksidan pada sampel ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) memiliki tingkat antioksidan yang kuat dengan nilai $IC_{50} 56,59 \mu\text{g/mL}$ dalam menghambat reaksi radikal bebas DPPH **Tabel 4**. Dalam reaksi ini, DPPH berperan sebagai radikal bebas yang bereaksi dengan ekstrak etanol.

Kuatnya aktivitas antioksidan berhubungan dengan adanya kandungan metabolit sekunder yang tersari pada proses ekstraksi, hal tersebut berhubungan jumlah metabolit sekunder dalam ekstrak daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume). Semakin besar kandungan senyawa golongan flavonoid maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Mekanisme flavonoid sebagai antioksidan adalah menangkap ROS secara langsung, menghambat regenerasi ROS dan secara tidak langsung dapat meningkatkan aktivitas antioksidan enzim antioksidan seluler. Flavonoid merupakan senyawa yang paling efektif sebagai scavenger spesies reaktif, misalnya super dioksida, radikal peroksil, dan peroksinitrit dengan cara mentransfer atom H^+ . Pencegahan terbentuknya ROS oleh flavonoid dilakukan dengan beberapa cara, yaitu menghambat kerja enzim xantin oksidase dan (NADPH) oksidase, serta mengkelat logam (Fe^{2+} dan Cu^{2+}) sehingga dapat mencegah reaksi redoks yang dapat menghasilkan radikal bebas. Hal inilah yang menyebabkan hubungan antara kandungan total fenol dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi nilai flavonoid maka semakin tinggi kemampuan antioksidan dalam mendonorkan elektronnya dalam hal menekan perkembangan radikal bebas.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} ekstrak etanol daun bitti sebesar $56,59 \mu\text{g/mL}$ yang dikategorikan dalam klasifikasi kuat.

REFERENSI

- [1] Rasyid FA, Miyako K, Fukuyoshi S, Goto. A Novel Clerodane Diterpene from *Vitex cofassus*. Chemical & Pharmaceutical Bulletin. 2017;65(1).
- [2] Anggarani, M.A., Ilmiah, M. and Mahfudhah, D.N. Literature Review of Antioxidant Activity of Several Types of Onions and Its Potential as Health Supplements. Indonesian Journal of Chemical Science. 2023:p-ISSN 2252-6951 e-ISSN 2502-6844.
- [3] Susantiningih, T. Biokimia Stres Oksidatif dan Prosedur Laboratorium (2 ed.) CV. Anugrah Utama Raharja; 2021
- [4] Tandung, A.R., Manik, M.D, Putri, T.Z.A.D. Hempaskan Nyamuk *Aedes aegypti* L. dengan Ekstrak Buah Bitti (*Vitex cofassus*). Jurnal Farbal. 2019 7(2):50-51.
- [5] Wulan and Yudistira, A. Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun *Mimosa pudica* Linn. menggunakan Metode DPPH. Jurnal Pharmacon. 2019 8(1) :109.
- [6] Syarif RA, Muhajir M, Ahmad AR, Malik A. Identifikasi Golongan Senyawa Antioksidan dengan Menggunakan Metode Peredaman Radikal DPPH Ekstrak Etanol Daun *Cordia Myxa* L. Jurnal Fitofarmaka Indonesia. 2015;2(1)
- [7] Rani, A, Sharma, A. ‘The genus vitex: A Review’ Pharmacognosy Reviews. 2013. 7(14): 188.
- [8] Syamsu, R.F.,Rachman, M.E. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Tin (*Ficus carica*) dengan Metode DPPH dan FRAP. As-Syifaa Jurnal Farmasi. 2023 15(1): 81–84.
- [9] Wakhidatul Kiromah, N.Z., Husein S, Rahayu, T.P. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Ganitri (*Elaeocarpus Ganitrus* Roxb.) dengan Metode DPPH (2,2 Difenil-1-Pikrilhidazil). Pharmacon : Jurnal Farmasi Indonesia. 2021;18(1): 62–63.
- [10] Risasti, S., Fitri, Oktiansyah, R. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Tanaman Obat dari Famili Zingiberaceae. Prosiding SEMNAS BIO. 2023: 480 .

TABEL

Tabel 1. Hasil perhitungan persen rendamen ekstrak etanol Daun Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume)

Sampel	Berat sampel (g)	Berat ekstrak (g)	Rendamen ekstrak (%)
Daun Bitti (<i>Vitex cofassus</i> Reinw. Ex. Blume)	50	6,154	12,308

Tabel 2. Hasil analisis baku standar kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% inhibisi
2	0,530	38,940
4	0,472	45,622
6	0,427	50,806
8	0,383	55,875
10	0,351	59,562

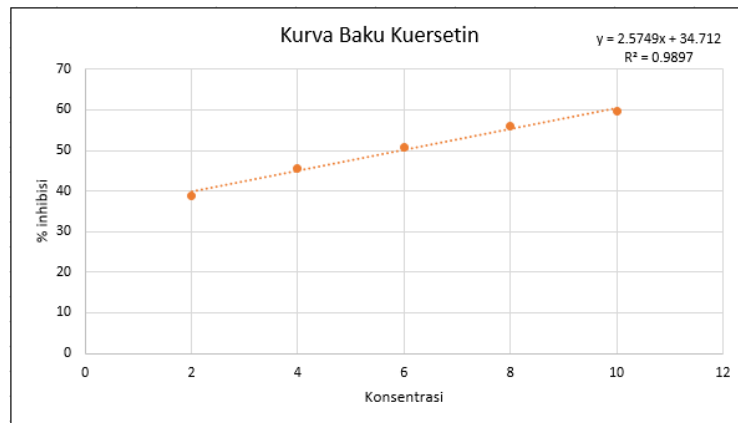
Tabel 3. Hasil pengukuran aktivitas antioksidan ekstrak etanol Daun Bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume)

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	% inhibisi
25	0,405	43,905
75	0,328	54,570
100	0,310	57,063
125	0,274	62,049
200	0,176	75,623

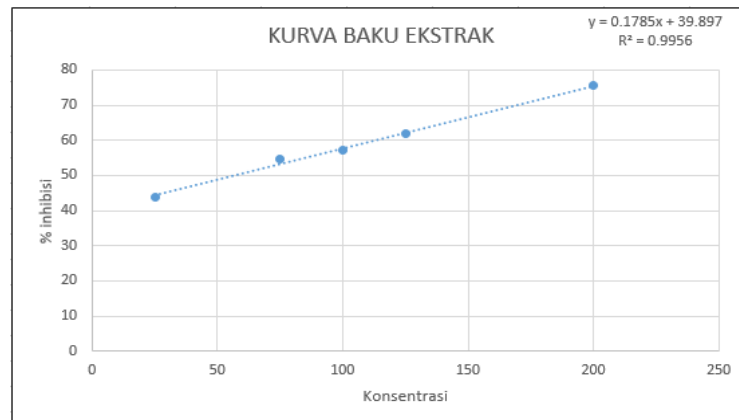
Tabel 4. Nilai IC_{50} baku standar kuersetin dan sampel

Sampel	Nilai IC_{50}	Klasifikasi kategori
Kuersetin	5,93 μ g/mL	Sangat kuat
Ekstrak etanol daun bitti	56,59 μ g/mL	Kuat

GAMBAR



Gambar 1. Kurva Baku Standar Kuersetin



Gambar 2. Kurva baku ekstrak etanol daun bitti (*Vitex cofassus* Reinw. Ex. Blume)