

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Daun Katang-Katang (*Ipomea Pes-Caprae*) Menggunakan Metode Dpph (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil)

Sri Yulanda Otoluwa^{1*}, Nita Suleman¹ dan La Ode Aman²

¹Jurusan Kimia, Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo, Indonesia

²Jurusan Farmasi, Universitas Negeri Gorontalo, Gorontalo, Indonesia

ABSTRAK

Tumbuhan katang-katang (*Ipomea pes-caprae*) yang hidup merambat dipesisir pantai dengan bunga berbentuk terompet dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami karena mampu mengambat radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak etil asetat daun katang-katang, serta mengetahui nilai aktivitas antioksidan ekstrak daun katang-katang. Metode yang dilakukan dengan metode ekstraksi sebanyak 500 gram serbuk daun katang-katang dimaserasi dengan etil asetat menghasilkan ekstrak kental etil asetat sebanyak 111,682 gram. Uji fitokimia menunjukkan hasil positif mengandung flavonoid, tannin dan triterpenoid. Proses pemisahan dilakukan dengan kromatografi kolom yang diperoleh 115 fraksi. Proses pemurnian dengan cara rekristalisasi. Isolat hasil rekristalisasi berupa kristal jarum berwarna putih dengan berat 10,5 mg. Hasil uji fitokimia diduga bahwa isolat merupakan senyawa flavonoid dan Spektrum FTIR menunjukkan bahwa senyawa yang terkandung dalam isolat murni diduga senyawa flavonoid ditandai dengan adanya gugus fungsi O-H, ikatan hydrogen, ulur alifatik -C-H, ulur keton C=O, ulur C=C, regangan cincin aromatik C=C, tekuk C-H, C-O alkohol, C-O-C dan monosubstitusi dalam cincin aromatik serta C=C aromatik.

Kata kunci: Antioksidan, *Ipomea pes-caprae*, Etil asetat

ABSTRACT

Bayhops (ipomea pescaprae) which grow on the with trumpet-shaped flowers, can be caused as source of natural antioxidants, because they can inhibit free radicals. This research aims to identify the content of secondary metabolite compounds from ethyl acetate extract of bayhops leaves, as well as to determine the antioxidant activity value of the leaves extract. This research applied an extraction method of 500 grams of bayhops leaves powder macerated with ethyl to produce a thick extract of ethyl acetate of 111,682 grams. Phytochemical tests show positive result containing flavonoids, tanins, and triterpenoids. The separation process is carried out using column chromatography, resulting in 115 fractions. Meanwhyle, the purification process is done by recrystallization. The isolate resulting from recrystallization is whyte needle crystalis weighning 10,5 mg. the results of the phytochemical test indicated that the isolate is a flavonoid compound, and the FTIR spectrum shows that the compound contained in the pure isolate is thought to be a flavonoid compound characterized by presence of the O-H functional group, hydrogen bonds, -C-H aliphatic stretch, C=O ketone stretch, C=C stretch, C=C aromatic ring stretch, C-H bending, C-O alcohols, C-O-C, and monosubstitutions in aromatic rings as well as C=C aromatics.

Keywords: Antioxidants, *Ipomes pes-caprae*, Ethyl Acetate

Received: 22-01-2024, Accepted: 20-06-2025, Online: 13-10-2025

PENDAHULUAN

Indonesia yang beriklim tropis merupakan Negara dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia setelah Brazil. Indonesia memiliki sekitar 25.000-30.000 sepises tanaman tanaman yang merupkan 80% dari jenis tanaman di dunia dan 90% jenis tanaman di Asia (Elisma et al., 2020). Masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu telah mengenal tanaman yang mempunyai kandungan obat atau dapat menyembuhkan berbagai macam penyakit.

*Corresponding author:
sriyulanda038@gmail.com

Tumbuhan *Ipomoea pes-caprae* di Indonesia dikenal salah satu jenis bakau yang umumnya dikenal dengan nama daun katang-katang. Selain itu tumbuhan ini di Gorontalo dikenal dengan batata pantai atau kangkung laut. Katang-katang merupakan tumbuhan dengan batang lurus dan panjang yang tumbuh menjalar serta menyebar ke segala arah. Memiliki bunga berwarna merah ungu berbentuk menyerupai terompet yang terdapat di pesisir pantai desa Bilato Kecamatan Bilato Provinsi Gorontalo. Tetapi kurangnya informasi kepada masyarakat setempat mengenai pemanfaatan tumbuhan di pesisir pantai Bilato menyebabkan tumbuhan terabaikan yang berdampak pada kerusakan habitatnya, sehingga perlu dimanfaatkan sebagai obat tradisional untuk mengobati sengatan ubur-ubur (Andayani & Nugrahani, 2018).

Beberapa penelitian telah melaporkan aktivitas farmakologis *I. pes-caprae* yaitu sebagai antioksidan, analgesik, anti-inflamasi, anti spasmodik, antinosiseptif, antihistamin, imunostimulan, insulinogenik, hipoglikemik, antimikroba, antijamur, dan antitumor pada kanker melanoma (Ashish et al. 2015). Berdasarkan penjelasan diatas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etil Asetat Daun Tumbuhan Katang-katang (*Ipomea Pes-caprae*) menggunakan Metode DPPH (1,1-difenil-2- pikrilhidrazil)

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi gelas kimia, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung reaksi, blender, neraca analitik, pipet volum, rotary evaporator, oven, seperangkat alat maserasi, penangas air, gelas kimia, termometer, kertas saring, shaker 60 mesh, corong pisah, pipet tetes, labu takar, botol reagen, corong Bucner, lemari asam, sendok, batang pengaduk, spatula, setrifugasi, plat KLT, bejana kromatografi, lampu UV₂₅₄ nm dan Spektrofotometer UV-VIS. Adapun bahan kimia atau pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etil asetat (C₄H₈O₂), n-heksan (C₆H₁₄), aquades (H₂O), pb asetat (Pb(CH₃COO)₂), asam klorida (HCl) 2N, pereaksi mayer, reagen Dragendorff, reagen wagner, besi klorida (FeCl₃) 1%, kloroform (CHCl₃), asam asetat glasial (CH₃COOH), asam sulfat (H₂SO₄), asam klorida (HCl), silika gel F254, n-butanol (C₄H₁₀O), etanol (C₂H₅OH), quercetin, aluminium klorida (AlCl₃)2%, kalium asetat (CH₃CO₂K), eter (C₂H₅)₂O, gas N₂, natrium nitrit (NaNO₃) 5%, natrium hidroksida (NaOH)1N, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), vitamin C. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun tumbuhan katang- katang yang diperoleh dari pesisir pantai Kecamatan Bilato Kabupaten Gorontalo.

Metode Penelitian

Determinasi Tanaman

Determinasi daun tumbuhan katang-katang bertujuan untuk mengetahui dan memastikan familia dan spesies tumbuhan yang dilakukan di Laboratorium Biologi, Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Universitas NegeriGorontalo.

preparasi Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah daun katang-katang (*Ipomea pes-caprae*) yang diperoleh dari pesisir pantai desa Bilato, Kecamatan Bilato, Kabupaten Gorontalo. Waktu pengambilan sampel pada sore hari yang berujuan agar proses fotosintesis telah sempurna daun katang-katang sebanyak mungkin yang masih segar berwarna hijau, belum terlalu tua, sehat, dan tidak berpenyakit. Daun yang sudah dikumpulkan dibersihkan dengan air mengalir, setelah itu dipotong kecil-kecil, kemudian ditimbang dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan pada suhu kamar tanpa terkena matahari langsung langsung selama beberapa hari sampai benar-benar kering karena pada pengeringan dengan suhu yang terlalu tinggi akibat paparan sinar matahari secara langsung dapat merusak komponen aktif. Sampel yang sudah kering kemudian diblender hingga menjadi serbuk tujuan untuk memperkecil ukuran serbuk dan memperluas permukaan serbuk.

Ekstraksi Maserasi

Ekstrak daun katang-katang dimaserasi dengan pelarut etil asetat selama 3 x 24 jam pada suhu kamar. Ekstrak metanol (maserat) yang didapat kemudian disaring menggunakan corong buchner dan kertas saring whatman, kemudian dievaporasi pada suhu 30oC. Hasil evaporasi yang diperoleh selanjutnya diamkan pada suhu kamar hingga didapat ekstrak kental berbentuk pasta. Persen rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan persamaan 1.

$$\text{Rendemen \%} = \frac{\text{Berat Ekstrak Kental (g)}}{\text{Berat Sebuk Simplisia (g)}} \times 100\% \quad (1)$$

Skrining Fitokimia

Ekstrak etil asetat daun katang-katang dilakukan uji fitokimia secara kualitatif untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel (Febrianti et al., 2018) sebagai berikut:

Uji Flavonoid

Ekstrak kental etil asetat daun katang-katang ditimbang 0,1 gram dilarutkan dengan dalam 10 ml etil asetat kemudian dibagi 4 tabung reaksi, tabung pertama, kedua dan ketiga berturut-turt ditambahkan Mg-HCl pekat, NaOH, H₂SO₄ pekat, dan tabung keempat digunakan sebagai kontrol. Warna masing-masing tabung dibandingkan dengan kontrol. Apabila terbentuk warna jingga, merah atau kuning menunjukkan adanya flavanoid pada ekstrak kental daun katang-katang.

Uji Alkaloid

Ekstrak kental etil asetat daun katang-katang sebanyak 0,1 g dilarutkan dengan beberapa mL etil asetat, dibagi dalam 5 tabung reaksi, masing-masing tabung ditambahkan satu atau dua tetes pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendorf dalam tabung reaksi berbeda, serta tabung kelima digunakan sebagai kontrol. Warna masing-masing tabung dibandingkan dengan kontrol. Reaksi positif ditandai dengan adanya endapan putih atau kekuningan pada pereaksi Mayer, munculnya warna-kehitaman pada pereaksi Wagner, dan adanya endapan orange pada pereaksi Dragendorf.

Uji Tanin

Ektrak kental etil asetat daun katang-katang sebanyak 0,1 ditambahkan dengan 5 ml aquadest, direaksikan dengan larutan FeCl₃ 1%, jika terjadi warna biru tua, biru kehitaman atau hitam kehijauan menunjukkan adanya senyawatanin.

Uji Steroid/ Terpenoid

Ekstrak kental etil asetat daun katang-katang dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Selanjutnya, ekstrak ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida dan 1-2 mL larutan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Golongan senyawa steroid akan menunjukkan warna biru kehijauan dan senyawa triterpenoid akan menunjukkan cincin kecoklatan atau violet pada pembatas dua pelarut.

Uji Saponin

Ekstrak kental daun katang-katang sebanyak 0,1 g ditambahkan 10 ml akuadest panas kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Pada penambahan HCl 2N, buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin.

Pemisahan dan Pemurnian

Kromatografi Lapis Tipis

Pada pemisahan senyawa aktif dilakukan metode kromatografi lapis tipis terlebih dahulu yang bertujuan untuk menentukan fase gerakan terbaik yang akan digunakan pada KLT. Pada metode KLT menggunakan fase diam silika gel F254 dan fase gerakanya yaitu komposit dari larutan n-butanol, asam asetat glasial, dan udara. Fraksi etil asetat daun katang-katang yang dilarutkan dalam etanol, selanjutnya ditotolkan pada plat yang berukuran 10×10 cm. kemudian plat KLT dimasukkan ke dalam bejana yang berisi larutan pengembang. setelah pengembangan selesai, plat dikeluarkan dan dibiarkan sampai fase gerakanya menguap, kemudian dilihat bercak noda dan dihitung nilai Rf nya. Pemisahan yang menghasilkan noda terbanyak dan terpisah dengan baik yang akan digunakan sebagai eluen dalam diskon KLT preparatif (Sariningsih et al., 2015). Setelah didapatkan eluen yang terbaik maka akan dilakukan pemisahan senyawa aktif dari fraksi etil aseta daun katang-katang yang dilakukan dengan KLT preparatif menggunakan fase diam silika gel F254.

Fraksi etil asetat daun katang-katang dilarutkan dalam etanol, kemudian larutan diteteskan terlebih dahulu pada pelat KLT berukuran 20×20 cm yang telah disemprotkan dimasukkan ke dalam bejana yang berisi larutan pengembang. Setelah pengembangan selesai, pelat dilepas dan dibiarkan hingga fase gerakanya menguap. Untuk mengetahui titik-titik pita yang akan dikerok, pelat diamati di bawah lampu UV254 dan segera diberi tanda pada pelat yang akan dikerok (Wahdaningsih et al., 2011). Selanjutnya nilai Rf dihitung dengan menggunakan persamaan 2.

$$Rf = \frac{\text{jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{jarak garis depan pelarut dari titik awal}} \quad (2)$$

Kromatografi Kolom

Ekstrak etil asetat sebanyak 4 gr di pisahkan dengan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel GF60 dan dielusi berturut-turut menggunakan pelarut organik seperti n-heksan, metanol, etil asetat dengan perbandingan tertentu. Fraksi-fraksi yang diperoleh dari tahapan kromatografi kolom dilakukan proses kromatografi lapis tipis kembali untuk mengabungkan fraksi-fraksi yang sama harga Rf-nya. Pola noda akan terbentuk pada setiap fraksi. Jika isolat tetap menunjukkan pola noda tunggal, maka isolat telah murni.

Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Pada penelitian ini penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) secara *in vitro* karena lebih singkat dibandingkan dengan metode lain dan secara luas telah digunakan untuk menduga aktivitas antioksidan berbagai senyawa.

Pembuatan Larutan DPPH 50 ppm

Sebanyak 19 mg serbuk DPPH ditimbang dan dilarutkan dengan etanol proanalisa hingga 250 ml dalam labu ukur. Larutan DPPH disimpan dalam botol gelap.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Larutan DPPH 50 ppm sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan direaksikan dengan etanol pro analisa sebanyak 4 mL, dihomogenkan menggunakan vorteks, lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

Pembuatan dan Pengukuran Larutan Vitamin C

Pembuatan larutan induk vitamin C (1000 ppm)

Sebanyak 40 mg vitamin C murni ditimbang dan dilarutkan dengan etanol pro analisa hingga volume 100 ml dalam labu ukur sehingga didapat larutan induk vitamin C dengan konsentrasi 400 ppm.

Pembuatan dan pengukuran larutan seri vitamin C (25, 50, 100, 200, dan 400 ppm)

Pengukuran aktivitas dilakukan dengan mengencerkan larutan induk dengan cara, masing-masing dipipet 12,5 ml dari larutan induk vitamin C dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL kemudian dicukupkan volumenya dengan etanol pro analisa. Masing-masing konsentrasi kemudian diambil sebanyak 4 ml. Selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dengan bantuan pusaran dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516,1 nm.

Pembuatan dan Pengukuran Larutan Uji Ekstrak Daun Katang-katang

Pembuatan larutan induk bahan uji (400 ppm)

Sebanyak 40 mg ekstrak kental ditimbang dan dilarutkan dengan etanol proanalisa hingga volume 100 ml dalam labu ukur sehingga didapat larutan induk vitamin C dengan konsentrasi ppm.

Pembuatan dan pengukuran larutan seri bahan uji (25, 50, 100, dan 200ppm)

Pengukuran aktivitas dilakukan dengan mengencerkan larutan bahan uji masing-masing konsentrasi kemudian diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan DPPH sebanyak 4 ml dalam tabung reaksi, selanjutnya campuran tersebut dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit. Larutan kemudian diukur serapannya dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 516,1 nm.

Perhitungan

Penentuan Persen Inhibisi

Aktivitas penangkal radikal diekspresikan sebagai persen inhibisi dengan menggunakan persamaan 3.

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

Penentuan Nilai IC₅₀

IC₅₀ yang didapat dari nilai $y = ax + b$ dengan $y = 50$ dari hasil persamaan regresi linear antara presentase inhibisi dengan berbagai konsentrasi ekstrak tumbuhan. Nilai IC₅₀ ini berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin tinggi kandungan antioksidannya yang terdapat dalam sampel untuk merendam radikal bebas DPPH, maka nilai IC₅₀ semakin rendah.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Determinasi Tanaman

Tanaman Katang-katang telah dilakukan uji determinasi di Laboratorium Biologi, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Gorontalo. Surat keterangan hasil identifikasi No.021/UN47. B4. Bio. Lab Bio/LL/2022. Determinasi tanaman dilakukan untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian dan menghindari kesalahan dalam pengambilan sampel. Hasil determinasi tanaman menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah daun tanaman katang-katang dengan nama latin *Ipomea pes-caprae*.

Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun katang-katang, lokasi pengambilan sampel di Desa Bilato, Kecamatan Bilato, Kabupaten Gorontalo. Daun katang-katang yang segar dicuci sehingga bersih dari kotoran yang mungkin menempel pada daun, helai daun dipisahkan dari tulangnya setelah itu ditimbang sebagai berat basah kemudian dilakukan proses pengeringan dengan cara diangin-anginkan selama kurang lebih 14 hari pada suhu ruang tanpa terkena sinar matahari secara langsung. Proses ini dilakukan dengan tujuan menghilangkan kandungan udara pada sampel tanpa merusak struktur senyawa kimia yang terkandung di dalamnya. Proses pengeringan selain untuk mengurangi kadar udara juga bertujuan agar sampel dapat disimpan dalam waktu yang lama dan bisa menghentikan proses enzimatik yang dapat menurunkan mutu simplisia serta menghindari simplisia ditumbuhi jamur (Yulianti, K. 2020). Berat daun katang-katang segar yang diambil adalah 4 kg. Setelah diperoleh

simplisia kering kemudian ditimbang, selanjutnya simplisia dihaluskan untuk memperoleh serbuk simplisia dengan menggunakan blender. Berat serbuk halus yang diperoleh adalah 700 g. Tujuan dari pembuatan serbuk simplisia ini adalah agar mengukur partikelnya kecil dan untuk memperbesar luas kontak permukaan antara simplisia dan pelarut pada proses ekstraksi, sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh lebih optimal atau semakin pekat ekstrak yang diperoleh (Marjoni, 2016).

Metode maserasi digunakan karena merupakan metode yang paling mudah dilakukan, karena pengerjaannya yang sederhana dan alat-alat yang digunakan mudah didapat (Wardhani & Sulistyani, 2012). Pada saat proses maserasi dilakukan pengadukan selama 1 jam setiap 24 jam sekali (Permadi et al., 2021). Tahap selanjutnya dilakukan remaserasi dengan cara penyaringan terlebih dahulu untuk memisahkan filtrat dengan maseratnya menggunakan kain kapas, setelah itu maserat dilakukan perendaman kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat (teknis) yang baru dan dilakukan pengadukan juga selama 24 jam sekali dengan lama perendaman 3x24 jam. Tujuan dari proses remaserasi ini yaitu untuk menarik senyawa kimia yang mungkin masih belum tersari pada saat proses maserasi (Permadi et al., 2021).

Hasil filtrat dari proses penyaringan dilakukan pemekatan dengan menggunakan alat vacum rotary evaporator pada suhu 40°C. Prinsip kerja dari alat ini yaitu dengan menggunakan tekanan yang mengakibatkan pelarutan menguap pada suhu di bawah titik dididhnya. Evaporasi bertujuan untuk menguapkan pelarut agar hanya senyawa aktif dalam sampel yang tidak rusak akibat pemanasan yang berlebihan. (Hermansah dkk., 2015). Hasil evaporasi ekstrak kental etil asetat berwarna hijau kehitaman sebanyak 111, 6082 gr dengan rendemen sebanyak 22,32%.

Uji Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan suatu metode yang dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak tanaman. Skrining fitokimia dilakukan untuk memberikan gambaran awal mengenai kandungan golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam simplisia maupun ekstrak. Skrining fitokimia dilakukan dengan menggunakan reagen pendeteksi golongan senyawa seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, dan lain-lain (Putri dkk. 2013). Hasil skrining fitokimia ekstrak etil asetat menunjukkan hasil positif terhadap uji flavonoid, steroid dan tanin. Hasil yang diperoleh dapat dilihat dari Tabel 1 di bawah ini.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Daun Katang-katang

Senyawa Metabolit Sekunder	Pereaksi	Hasil
Flavonoid	MgHcl	(+) Terjadi perubahan warna kuning
	NaOH	memudar (+) Terjadi perubahan warna kuning
	H2SO4 pekat	kecoklatan (+) Terjadi perubahan warna hijau kehitaman
Alkaloid	Mayer	(-) Tidak terbentuk endapan
	Hager	(-) Tidak terbentuk endapan
	Wagner	(-) Tidak terbentuk endapan
	Dragendor f	(-) Tidak terbentuk endapan
Tanin	FeCl3	(+) Terjadi perubahan warna hijau kehitaman
Steroid dan Triterpenoid	Liberman-Buchard	(+) Terbentuk cincin kecoklatan
	Aquades	(-) Tidak terbentuk busa yang stabil

Berdasarkan Tabel 1 hasil uji fitokimia dalam ekstrak daun katang-katang identifikasi yang pertama menggunakan pereaksi Wilstater yaitu penambahan HCl pekat dan serbuk Mg pada larutan ekstrak daun sirsak. Hasil yang diperoleh menunjukkan reaksi positif dengan terbentuknya warna merah-oranye. Penambahan larutan HCl berfungsi untuk mendeteksi senyawa yang mengandung inti benzopiranon, sehingga akan menghasilkan garam benzopirilium yang disebut juga garam flavilium. Penambahan Mg dan HCl terjadi reaksi reduksi menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna oranye pada flavonol (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Pengujian alkaloid menunjukkan hasil negatif yang ditandai dengan tidak terbentuknya endapan pada ekstrak yang ditambahkan pereaksi Mayer, Wagner, dan Dragendrof. Ekstrak etil asetat daun katang-katang pada penelitian ini tidak mengandung senyawa alkaloid diperkirakan karena faktor suhu yang terlalu tinggi dan perbedaan polaritas antara senyawa alkaloid dan pelarut.

Alkaloid merupakan senyawa yang bersifat basa. Pengujian alkaloid dengan menggunakan pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendrof tidak menghasilkan endapan yang terbentuk dari pergantian ligan (Simaremare 2014). Endapan terbentuk karena atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid mengganti ion iod dalam pereaksi Mayer dan Dragendrof melalui ikatan kovalen. Jika tidak terbentuk endapan berwarna , putih pada reagen Mayer, coklat kemerahan pada pereaksi Wagner atau jingga pereaksi Dragendrof maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak tidak mengandung senyawa alkaloid.

Adanya senyawa tanin pada ekstrak etil asetat daun katang-katang ditandai dengan adanya perubahan larutan ekstrak menjadi hijau kehitaman dan disertai terbentuknya pengendapan. Perubahan warna tersebut terjadi karena adanya reaksi yang terjadi antara gugus senyawa tanin dengan reagen FeCl_3 1%. Simaremare (2014) mengemukakan bahwa gugus hidroksil pada senyawa tanin akan bereaksi dengan reagen FeCl_3 1% sehingga dapat terjadi perubahan warna ekstrak menjadi hijau kehitaman. Tanin merupakan senyawa makromolekul dari senyawa polifenol yang bersifat polar. Umumnya senyawa tanin akan larut dalam pelarut polar. Sajib dkk. (2015) mengemukakan bahwa secara signifikan senyawa tanin terdapat pada ekstrak metanol daun katang-katang. Hasan dkk. (2017). Meski demikian, pelarut etil asetat mampu menarik senyawa tanin dalam daun katang-katang, diduga gugus hidroksil pada senyawa tanin mampu berikatan dengan gugus metoksil atau gugus hidroksil pada pelarut etil asetat.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa dalam sampel daun katang-katang positif mengandung triterpenoid, ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan pada larutan uji setelah penambahan asam sulfat pekat sebanyak 2 ml melalui dinding tabung. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa daun katang-katang mengandung metabolit sekunder triterpenoid menunjukkan bahwa senyawa tersebut memiliki aktivitas sebagai antibakteri yaitu monoterpenoid linalool, diterpenoid, fitol, triterpenoid saponin, triterpenoid glikosida (Marlinda, 2013).

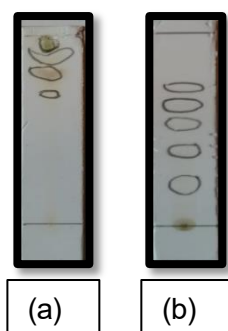
Pemisahan dan Pemurnian

Kromatografi Lapis Tipis

Sebelum melakukan proses identifikasi secara KLT, pelat KLT terlebih dahulu diberi batas atas dan batas bawah. Setelah itu ekstrak daun katang-katang dielusi dengan etil asetat dan ditotolkan pada lempeng KLT yang berukuran 1x5 cm dan dielusi dengan eluen yang sesuai kemudian diamati di bawah lampu UV dengan gelombang 254 nm.

Proses identifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis menggunakan eluen n-heksan: etil asetat dengan perbandingan 9 : 1, 8 : 2 dengan jarak tempuh pelarut 4 cm. Tujuan dipilihnya dua pelarut tersebut karena masing-masing pelarut memiliki kepolaran yang berbeda sehingga senyawa-senyawa dengan kepolaran yang berbeda dapat dipisahkan dengan eluen tersebut. N-heksan adalah eluen yang bersifat non polar dan etil asetat bersifat polar. diperoleh ulasan yang baik karena noda memisah dengan jelas dengan semakin non polarnya sifat eluen. Terlihat pada eluen dengan perbandingan 8 : 2 noda memisah dengan baik. Noda yang diperoleh akan semakin sebanding dengan sifat ke non polaran dari eluen yang digunakan. Pemilihan n-heksan : etil asetat karena dapat memisahkan senyawa non polar, semipolar

maupun polar, sehingga bercak hasil elusi dapat diidentifikasi golongan senyawanya. Eluen yang baik ialah eluen yang bisa memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda. Deteksi bercak dengan menggunakan sinar UV 254 nm terlihat pada gambar 1.



Gambar 1 (a) Eluen nHeksan : Etil Asetat (9:1), (b) Eluen nHeksan : Etil Asetat (8:2)

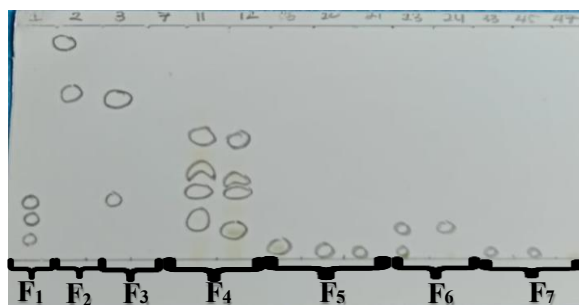
Kromatografi Kolom

Isolasi dengan kromatografi kolom dilakukan dengan menggunakan rangkaian alat kromatografi kolom yang ditegakkan dengan statif. Kemudian sejumlah kapas dimasukkan ke dalam bagian paling bawah dari kolom yang bertujuan untuk menahan silika atau adsorban agar tidak keluar dari kolom. Menimbang silika gel sebanyak 25 g kemudian dioven selama 2 jam. Sebanyak 16 g silika gel dicampurkan dengan ekstrak sebanyak 6 g yang telah dilarutkan dengan pelarut etil asetat sehingga terbentuk seperti bubuk. Kemudian dimasukkan ke dalam kolom secara perlahan dialiri n-heksan sambil kran terbuka untuk mencegah terbentuknya patahan dalam kolom hingga benar-benar padat. Hasil pencarian ditampung dalam botol vial dan diberi nomor. Elusi dilanjutkan dengan pelarut gradien n-heksana 100%, n-heksan : etil asetat 9:1 dan seterusnya, diganti dengan etil asetat 100% kemudian perbandingan etil asetat : metanol 9:1 dan metanol 100% yang ditambahkan beberapa tetes HCl pekat hal ini dilakukan agar kolom jernih Kembali atau sudah tidak ada senyawa disebabkan senyawa yang tersisa dalam kolom sangat polar sehingga HCl diperlukan untuk menarik senyawa yang sangat polar tersebut dan diperoleh sebanyak 105 fraksi.

Fraksi-fraksi tersebut selanjutnya diambil perwakilan berdasarkan perbandingan eluen dan warna-warna yang berbeda untuk diuji dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Pemilihan dikhususkan pada kelompok fraksi nomor 1, 2, 3, 7, 11, 12, 16, 20, 21, 23, 24, 33, 45, 47, 50, 59, 60, 61, 62, 63, 70, 71, 72, 75, 76,80, 83, 88. KLT dilakukan untuk melihat pola kromatogram komponen senyawa yang terkandung dalam ekstrak. Fase diam yang digunakan yaitu plat silika gel 60 GF254, sedangkan fase gerak yang digunakan yaitu campuran pelarut yang dapat memberikan verifikasi yang baik yaitu n- heksana : etil asetat = 9:1. Plat silika gel dibuat dengan ukuran 7×5 cm dan diberi garis batas awal dan batas akhir elusi 0,5 cm.

Fraksi yang akan diuji dilarutkan dalam pelarut, kemudian ditotolkan pada garis batas awal elusi lalu dikeringkan. Setelah totolan tersebut mengering, lempengan ditempatkan dalam sebuah ruangan tertutup berisi pelarut dalam jumlah yang tidak terlalu banyak. Perlu diperhatikan bahwa batas pelarut berada di bawah garis dimana posisi bercak berada. Alasan untuk menutup ruang adalah untuk menjamin bahwa kondisi dalam ruang terjenuhkan oleh uap dari pelarut. Kondisi jenuh dalam ruang mencegah penguapan pelarut.

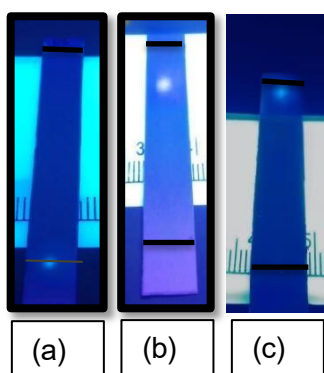
Pelarut pada lempengan bergerak lambat, komponen-komponen yang berbeda akan bergerak pada kecepatan yang berbeda, sehingga akan tampak perbedaan yang bercak. Setelah eluen mencapai garis akhir elusi, lempeng dikeluarkan dan dikeringkan. Pengujian dengan KLT dilakukan pada masing-masing fraksi. Fraksi yang menampakkan bercak yang sama digabungkan dan diuapkan pelarutnya. sehingga diperoleh 8 gabungan fraksi dapat dilihat pada gambar 2:



Gambar 2. Profil Kromatografi lapis tipis hasil pemisahan kromatografi kolom fasa gerak n-Heksan : etil asetat (9:1), F₁: (fraksi 1), F₂: (fraksi 2), F₃: (fraksi 3-4), F₄: (fraksi 11-12), F₅: (fraksi 13, 20, 21), F₆: (fraksi 23-24), F₇: (fraksi 45, 47).

Dari semua fraksi tersebut terlihat bercak yang masih banyak, yang menunjukkan bahwa masing-masing fraksi tersebut belum mendapatkan senyawa murni. Hasil analisis kromatografi lapis tipis diperoleh 10 fraksi yang dipilih untuk pemurnian Kembali adalah F₄ (11-12) dengan pertimbangan yang menunjukkan pola noda dan fragmentasi yang baik dan terbentuknya kristal.

Senyawa hasil isolasi sulit diperoleh berupa senyawa murni karena terdiri dari banyak senyawa gabungan, sehingga dilakukan pemurnian Kembali. Untuk senyawa berbentuk kristal pemurniannya dapat dilakukan dengan rekristalisasi, yaitu berdasarkan perbedaan kelarutan antara zat utama yang dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok. Pelarut yang dipilih berdasarkan kemampuan melarutkan zat yang akan dimurnikan. Adanya perbedaan kelarutan akibat penambahan pelarut lain akan menyebabkan senyawa utama akan mengkristal lebih dahulu. Pada fraksi yang terbentuk kristal, dibersihkan dari pengotornya dengan melarutkannya dengan pelarut yang cocok. Proses rekristalisasi diulang beberapa kali sehingga diperoleh senyawa berbentuk kristal yang lebih murni dan diperoleh fraksi yang menunjukkan noda tunggal. Setelah dilakukan beberapa kali rekristalisasi, maka yang diduga menjadi isolat murni adalah isolat nomor vial 13 dan didapat kristal sebanyak 10,5 mg terlihat pada gambar 3. :



Gambar 3. Profil Kromatografi Lapis Tipis Isolat dengan menggunakan Eluen (a) n-Heksan : Etil Asetat (1:9), (b) Etil asetat : Metanol (7:3), (c) Etil Asetat : Metanol (5:5)

Uji Fitokimia Isolat

Isolat murni hasil kromatografi kolom diuji fitokimia untuk mengidentifikasi senyawa aktif metabolit sekunder hasil uji fitokimia isolat dari daun katang-katang ekstrak etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid. Bisa dilihat pada tabel 2:

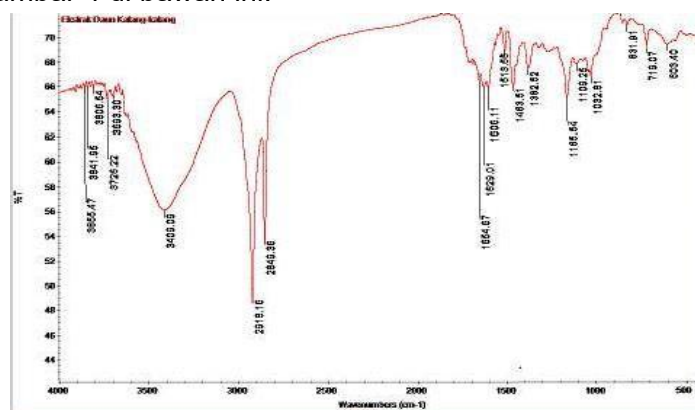
Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Isolat Murni

Senyawa Metabolit Sekunder	Pereaksi	Perubahan yang terjadi
Flavonoid	HCL + serbuk mg	(+) Terjadi perubahan warna bening kecoklatan
	NaOH Pekat	(+) Terjadi perubahan bening kecoklatan dan terbentuk endapan
	H ₂ SO ₄	(-) Tidak terjadi perubahan warna
Steroid	FeCl ₃	Tidak terjadi perubahan
Tanin	Liberman- Buchard	Tidak terjadi perubahan

Berdasarkan Tabel 2. hasil uji fitokimia isolat daun katang-katang ekstrak etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid terjadinya perubahan warna menjadi keruh putih dan terbentuknya endapan serta negatif pada steroid, dan tanin. Hal ini dapat dilihat dari tidak adanya perubahan yang terjadi pada penambahan pereaksi untuk mendeteksi senyawa alkaloid, steroid, dan tanin.

Identifikasi Senyawa

Uji kualitatif kedua menggunakan spektrofotometer IR untuk melihat karakter dan gugus fungsi daun katang-katang hasil isolasi yang merupakan isolat murni. Hasil spektrofotometri IR dapat dilihat pada Gambar 4 di bawah ini.



Gambar 4. Spektrum Hasil Isolat

Dari gambar spektrum FTIR terlihat serapan bilangan gelombang dan terbentuk pita tajam, bentuk pita lebar dan intensitasnya. Prediksi gugus fungsi yang terbaca dari isolat murni dengan melihat serapan bilangan gelombang terlihat pada tabel 3:

Tabel 3. Data Spektrum FTIR Isolat Murni

Bilangan Gelombang (cm^{-1})				Bentuk pita	Intensitas	Prediksi gugus fungsi
Isolat	Manigauha et al., 2021	Benerjee et al., 2013	Kumara Dewi et al., 2017			
3855, 47-3806, 54	3958, 9- 3872, 9		3855, 70	Tajam	Lemah	Ikatan Hidrogen
3409, 09	3756, 0- 3236, 8	3437	3483, 44-3221, 12	Lebar	Kuat	O-H
2918, 16-2849, 36	2924, 2- 2858, 0	2931	2926, 95-2829, 57	Tajam	Kuat	-C-H ulur alifatik str
1629, 01-1606, 11	1603, 7	1664	1658, 78	Lebar	Kuat	C=O ulur
1513, 55	1594, 4- 1525, 6	1511		Tajam	Lemah	C=C regangan cincin aromatik
1463, 51-1382, 52		1434	1448, 54-1411 89	Tajam	kuat	C-H tekuk
1165, 54-1109, 25	1166, 00		1114, 86	Tajam	Lemah	C-O alkohol
1032, 81	1026, 7			Tajam	Kuat	C-O-C
831, 91- 719, 07	763, 5			Tajam	Lemah	Monosubstitusi dalam cincin aromatik
603, 40- 447, 10	541, 7- 486, 2		590, 22- 424, 34	Lebar	Lemah	C=C aromatik

Analisis hasil spektroskopi IR menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi dapat mempunyai gugus fungsi O-H, ikatan hidrogen, regangan alifatik -C-H, regangan C=C, regangan cincin aromatik C=C, pembengkokan C-H, alkohol C-O, C-O-C dan monosubstitusi pada cincin aromatik. dan C =C aromatik. Berdasarkan interpretasi data yang diperoleh dari analisis spektrum inframerah (IR), diperkirakan isolat pada ekstrak etil asetat mengandung senyawa flavonoid.

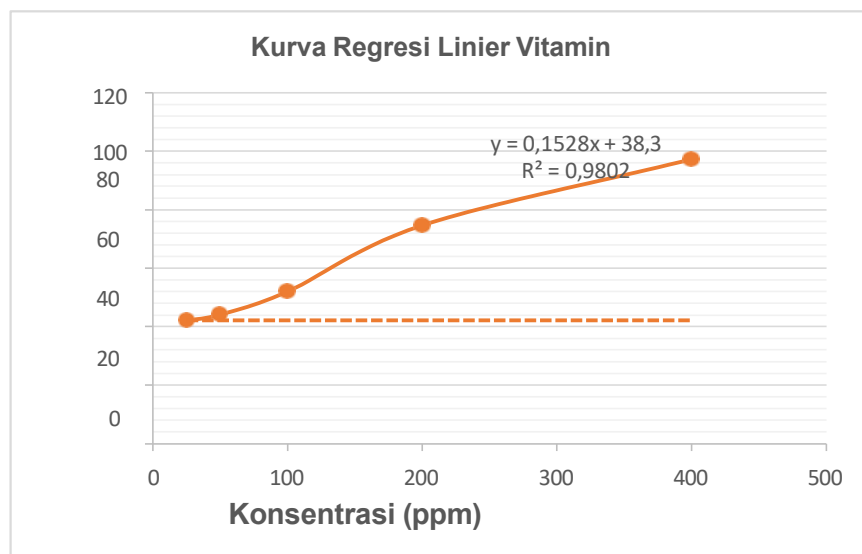
Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Metode uji aktivitas antioksidan terhadap radikal DPPH telah banyak diterapkan serta paling efektif dan efisien di antara metode lain untuk meniru aktivitas antioksidan (Maesaroh et al., 2018; Kedare & Singh, 2011). Prinsip metode DPPH adalah interaksi senyawa-senyawa antioksidan dengan DPPH yang akan menetralkan karakter radikal bebas dari DPPH. Sifat radikal bebas sebagai oksidan terletak pada kecenderungannya untuk menarik elektron, sedangkan antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas serta menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas (Wibawa et al., 2020). Dalam uji DPPH, kemampuan mendonor atom hidrogen dari ekstrak ditentukan dengan mengubah radikal DPPH menjadi nonradikal melalui proses reduksi. Jika semua elektron pada radikal bebas DPPH menjadi berpasangan maka warna larutan berubah dari ungu tua menjadi kuning pucat.

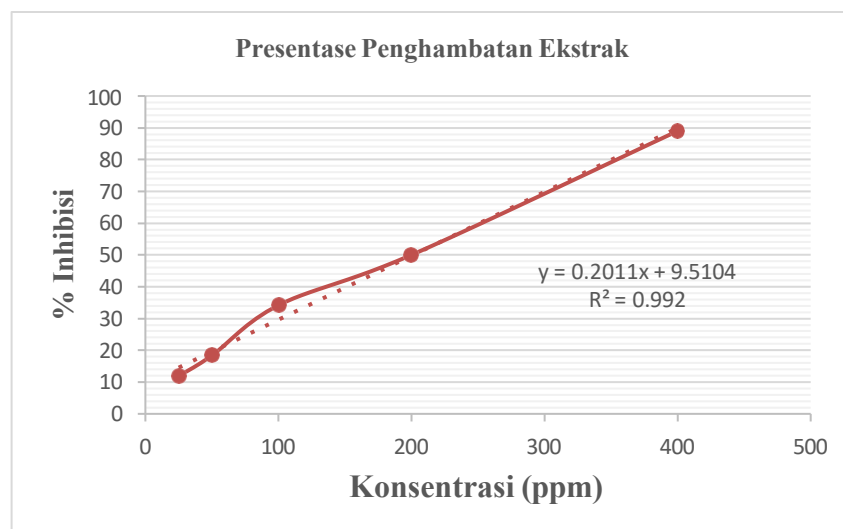
Uji aktivitas antioksidan dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada ekstrak kasar daun katang-katang dengan berbagai variasi konsentrasi. Larutan blanko digunakan untuk mengukur panjang gelombang max) DPPH sehingga diperoleh panjang gelombang 518 nm dengan absoransi blanko sebesar 0,354. Panjang gelombang tersebut sesuai dengan literatur yang menyatakan bahwa DPPH memiliki panjang gelombang maksimum 515-520 nm (Kedare & Singh, 2011).

Pada penelitian ini menggunakan asam askorbat (vitamin C) sebagai standar antioksidan untuk pembuatan kurva standar. Asam askorbat telah terbukti menjadi antioksidan yang efektif karena digunakan sebagai perbandingan (Maesaroh et al., 2018). Pengujian secara kuantitatif kemudian dilakukan terhadap ekstrak etil asetat daun katang-katang dan standar vitamin C seri konsentrasi 400; 200; 100; 50; dan 25 ppm. Kemudian dari masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 5 mL dan ditambahkan dengan DPPH sebanyak 1 mL. Larutan didiamkan selama 30 menit dalam ruang gelap. Larutan uji diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah diperoleh absoransi blanko dan ekstrak absorbansi dapat ditentukan dengan nilai persentasi penghambatan radikal DPPH (% inhibisi), kemudian dapat ditentukan nilai IC50 (Inhibitory Concentration) yang merupakan parameter untuk menunjukkan aktivitas antioksidan.

Absorbansi diplot terhadap konsentrasi vitamin C untuk mendapatkan kurva standar vitamin C, sedangkan presentase aktivitas penghambatan (% Inhibisi) radikal bebas DPPH diplot terhadap konsentrasi ekstrak untuk mendapatkan IC50 yang didefinisikan sebagai konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menyebabkan 50% penghambatan radikal bebas dihitung dengan persamaan yang dihasilkan dari regresi linier. Kekuatan antioksidan tergantung pada kemampuan untuk mereduksi radikal DPPH (IC50). Nilai IC50 berbanding terbalik dengan kapasitas antioksidan. Semakin tinggi kandungan antioksidan yang terdapat dalam sampel untuk menghambat radikal DPPH, maka nilai IC50 semakin rendah (Samirana et al., 2016; Al Ghasham et al., 2017). Kurva standar vitamin C dan presentase penghambatan radikal DPPH ekstrak etil asetat daun katang-katang masing-masing dapat dilihat pada gambar 5 dan 6.



Gambar 5. Hubungan Antara Variasi Konsentrasi Vitamin C terhadap Absorbansi



Gambar 6. Hubungan Antara Variasi Konsentrasi Etil Asetat Daun Katang- katang terhadap Presentse Penghambatan Radikal DPPH

Persamaan garis linier vitamin C (Gambar 6), yaitu $y = 0,0005x + 0,1266$ dengan koefisien korelasi (R) adalah 0,9802 yang menyatakan bahwa variasi konsentrasi dengan absorbansi mempunyai hubungan linier. Begitupun hasil persamaan garis linier ekstrak daun katang-katang (Gambar 7) diperoleh $y = 0,2011x + 9,5104$ dengan koefisien korelasi (R) adalah 0,992. Hasil ini menunjukkan kemampuan reduktif dari ekstrak daun katang-katang yang berbeda secara signifikan jika dibandingkan dengan standar vitamin C.

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak daun katang- katang secara nyata memiliki kemampuan reduktif terendah dibandingkan dengan standar vitamin C. Aktivitas antioksidan yang lemah antara lain disebabkan karena adanya senyawa aktif yang terekstrak bukanlah merupakan senyawa murni antioksidan. Selain itu, DPPH sensitif terhadap beberapa lewis dan jenis pelarut serta oksigen. DPPH hanya dapat larut dalam pelarut organik, dan gangguan absorbansi dari senyawa sampel dapat menjadi masalah untuk analisis kuantitatif (Kedare & Singh, 2011).

SIMPULAN

Ekstrak etil asetat daun katang-katang mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid, tanin, dan terpenoid sedangkan senyawa yang terkandung dalam isolat murni yaitu senyawa flavonoid

Hasil uji aktifitas antioksidan pada ekstrak etil asetat daun katang-katang mengandung antioksidan, berdasarkan hasil diperoleh nilai IC₅₀ yaitu sebesar ppm. Nilai IC₅₀ tersebut termasuk tingkatan sedang.

DAFTAR RUJUKAN

- Elisma, Havizur Rahman, & Uce Lestari. (2020). *Ppm pemberdayaan masyarakat dalam pengolahan tanaman obat sebagai obat tradisional di desa mendalo indah jambi luar kota*. 4(November), 274 277.
- Febrianti, D. R., Ariani, N., & Niah, R. (2018). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Kulit Jeruk Siam Banjar (Citrus reticulata)*. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 2.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). *Genesis and Development of DPPH Method of Antioxidant Assay*. *Journal Food Scientists & Technologists*, 48(4), 412 422.
- Marjoni, R. (2016). *Dasar-Dasar Fitokimia Untuk Diploma I I*. Jakarta: Cv. Trans Info Media.
- Hermansah, A., Harlia, & Zahara, T. A. (2015). *Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Batang Laban (Vitex Pubescens Vahl)*. *Jkk*, 4(2), 67 71
- Sariningsih, P., Rita, W. S., & Puspawati, N. M. (2015). *Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Flavonoid Ekstrak Daun Trembesi (Samanea saman (Jacq.) Merr) sebagai Pengendali Jamur Fusarium sp. pada Tanaman Buah Naga*. *Jurnal Kimia*, 9(1), 20 26.
- Permadi, Y. W., Rahmatullah, S., Prafitri, L. D., & Azmi, R. S. (2021). *Effervescent Granule Formulation Of Alpocate Seed Extract (Persea Americana Mill .) With Acid-Basic Concentration Variation Formulasi Granul Effervescent Ekstrak Biji Alpukat (Persea Americana Mill .) Dengan Variasi Konsentrasi Asam-Basa*. *Urecol*, 1(1), 722 738.
- Wahdaningsih, S., Styowati, E. P., & Wahyuono, S. (2011). *Aktivitas Penangkap Radikal Bebas dari Batang Pakis (Alsophilla glauca J. Sim)*. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 156 160.
- Wibawa, J. C., Arifin, M. Z., & Herawati, L. (2020). *Mekanisme Vitamin C Menurunkan Stres Oksidatif Setelah Aktivitas Fisik*. *JOSSAE (Journal of Sport Science and Education)*, 5(1), 57 63.
- Yulianti, K. (2020). *Analisis Kadar Dan Identifikasi Gugus Fungsi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Kloroform Daun Akar Bulu (Merremia vitifolia)*. Skripsi. Fakultas Sains. Universitas Cokroaminoto Palopo.