

Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun *Spigelia anthelmia* L. dan Uji Aktifitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazy)

Muhammad Taupik¹, A. Mu'thi Andy Suryadi², Jafar La Kilo^{3*}, Wiwit Zuriati Uno⁴, Samsul Bahri Badjeber⁵

^{1,2,3,4,5} Jurusan Farmasi Fakultas Olahraga dan Kesehatan, Universitas Negeri Gorontalo, Jl. Jenderal Sudirman No. 06 Kota Gorontalo 96128, Indonesia

* Penulis Korespondensi. Email: jafar.chem@ung.ac.id

ABSTRAK

Spigelia anthelmia adalah salah satu jenis tumbuhan gulma yang tergolong toksik dan termasuk dalam *handbook of poisonous and injurious plant*. *Spigelia anthelmia* termasuk dalam daftar tumbuhan *herb of medicine*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder dari ekstrak daun *Spigelia anthelmia* L. serta uji aktifitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhidrazy). Sampel diekstrak menggunakan metode maserasi total dengan menggunakan pelarut metanol dan dilanjutkan dengan partisi menggunakan pelarut N-heksan, etil asetat, dan metanol. Identifikasi kandungan senyawa metabolit sekunder menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis dengan eluen metanol : n-heksan (1:4), etil asetat : n-heksan (4:1), etil asetat : n-heksan (4:1) dan untuk uji aktifitas antioksidan menggunakan metode Spektrofotometri UV-Vis. Hasil identifikasi dengan kromatografi lapis tipis dengan menggunakan pereaksi semprot $AlCl_3$, lieberman buchard, dragendrof dan cerium sulfat menunjukkan bahwa ekstrak daun *Spigelia anthelmia* L. mengandung senyawa alkaloid, senyawa flavonoid dan senyawa terpenoid. Hasil uji aktifitas antioksidan dari ekstrak daun *Spigelia antelmia* L. dilakukan pada panjang gelombang UV 516 nm dengan nilai absorbansi yaitu 0,654 A. dengan persamaan linear yaitu $y = 0,027 x - 42,83$ dengan koefisien korelasi (R^2) = 0,983 dan memiliki IC_{50} yang paling kuat pada fraksi metanol yaitu 7,69 $\mu g/ml$.

Kata Kunci:

Spigelia anthelmia L.; Senyawa Metabolit Sekunder; Kromatografi Lapis Tipis; Spektrofotometri UV-Vis.

Diterima:
04-06-2022

Disetujui:
07-10-2022

Online:
01-12-2022

ABSTRACT

Spigelia anthelmia is a type of weed plant that is classified as toxic and is included in the list of herb of medicine. The research aims to determine the secondary metabolite content of *Spigelia anthelmia* L. leaves extract and antioxidant activity test using the DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazy) method. The research samples are extracted by applying the total maceration method with methanol as a solvent and followed by partition method using n-hexane, ethyl acetate, and methanol as solvents. The identification of flavonoid compounds content is performed by employing Thin Layer Chromatography method with methanol as eluent: n-hexane (1:4), ethyl acetate:n-hexane (4:1), ethyl acetate:n-hexane (4:1). Meanwhile, the antioxidant activity test is performed by employing UV-Vis Spectrophotometry method. The result of identification by thin layer chromatography using $AlCl_3$ spray reagent, Lieberman Burchard, Dragendrof, and cerium sulfate, indicate that the *Spigelia anthelmia* L. leaves extract contains alkaloids, flavonoids, and terpenoids. In addition, the antioxidant activity test of *Spigelia anthelmia* L. leaves extract is carried out at wavelength of UV 516 nm with an absorbance value of 0,654 A. with a

linear equation of $y = 0,027x - 42,83$ with a correlation coefficient (R^2) = 0,0983 and has the strongest IC_{50} at the methanol fraction for 7,69 $\mu\text{g/ml}$.

Copyright © 2022 Jsscr. All rights reserved.

Keywords:

Spigelia anthelmia L.Secondary; Metabolite Compounds; Thin Layer Chromatography; UV-Vis Spectrophotometry

Received:
2022 -06-04

Accepted:
2022 -10-07

Online:
2022 -12-01

1. Pendahuluan

Obat tradisional telah dikenal dan digunakan secara turun temurun oleh masyarakat Indonesia. Maraknya penggunaan obat tradisional di Indonesia berhubungan dengan banyaknya jenis tumbuhan di negeri ini. Pemanfaatan obat tradisional pada umumnya lebih diutamakan untuk menjaga kesehatan, meskipun pemanfaatan lainnya ditunjukkan untuk menjaga kesehatan, meskipun pemanfaatan lainnya ditunjukkan sebagai pengobatan suatu penyakit. Pada dasarnya obat tradisional ini dibuat dari tumbuhan atau campuran dari ekstrak tumbuhan untuk mengobati penyakit atau menjaga kesehatan.

Beberapa tanaman yang ada di Indonesia mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat diambil untuk dijadikan obat tradisional. Senyawa metabolit sekunder merupakan sumber bahan kimia yang tidak akan pernah habis, sebagai sumber inovasi dalam penemuan dan pengembangan obat-obat baru ataupun untuk menunjang kepentingan industri. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam tumbuhan mengandung zat bioaktif yang berkaitan dengan kandungan kimia dalam tumbuhan, sehingga sebagian tumbuhan dapat di jadikan sebagai bahan obat, salah satu tumbuhan yang dapat dijadikan obat adalah tumbuhan Gulma [1].

Tumbuhan gulma merupakan tanaman pengganggu yang kehadirannya tidak diinginkan oleh lahan pertanian karena menurunkan hasil yang bisa dicapai oleh tanaman produksi. Tumbuhan gulma terdiri dari berbagai macam jenis salah satunya adalah jenis *Spigelia anthelmia*. *Spigelia anthelmia* adalah salah satu jenis tumbuhan gulma yang tergolong toksik dan tercantum dalam *handbook of poisonous and injurious plant* oleh Nelson [2]. Pada penelitian Duke [3] *Spigelia anthelmia* termasuk dalam daftar tumbuhan *herb of medicine*.

Dengan berkembangnya ilmu pengetahuan maka pemanfaatan tanaman sebagai obat semakin maksimal, oleh karena itu penelitian ini menelusuri apakah tumbuhan gulma jenis ini memiliki aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH yang pada tiap fase pemisahan dimulai dari saat ekstraksi, partisi, fraksinasi sampai isolasi senyawa, sehingga diketahui senyawa aktif yang memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai senyawa obat. Metode DPPH digunakan dalam penelitian ini karena dapat menganalisis ada tidaknya senyawa antioksidan. Pengujian senyawa antioksidan pada tanaman *Spigelia anthelmia* L. perlu dilakukan lebih intensif, agar potensi tumbuhan ini dapat digunakan sebagai bahan obat yang bisa dikembangkan lagi.

2. Metode Penelitian Alat dan Bahan

Alat

Batang pengaduk, Blender (philips®), Cawan porselin, Gelas kimia (pyrex®), Gelas ukur (pyrex®), Kain saring, Kertas saring, Labu ukur (pyrex®), Lampu UV 366 nm (memmert type UN260®), Neraca analitik (Krem®), Pipet tetes, Sendok tanduk, Spektrofotometer UV-Vis (Shmidzu®), Toples kaca, Wadah.

Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah Alkohol 70%, Alumunium foil, Daun Kemangi Cina (*Spigelia anthelmia* L.), DPPH (Himedia) p.a, Etil asetat, Kloroform, Lempong KLT, pereaksi $AlCl_3$ p.a, pereaksi Cerium sulfat p.a, pereaksi Dragendorf p.a, pereaksi Lieberman Burchard p.a, Metanol, Metanol p.a, N-heksan.

Prosedur Penelitian

Pengumpulan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun *Spigelia anthelmia* L. yang diambil dari desa/kelurahan Tuladenggi, Kecamatan Duinggi, Kota Gorontalo, Provinsi Gorontalo.

Pembuatan Serbuk Simplisia

Cara pembuatan serbuk simplisia daun Kemangi Cina (*Spigelia anthelmia* L.) yaitu pertama dikumpulkan sampel yang akan digunakan. Dilakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau benda asing yang ada pada sampel. Lalu dilakukan pencucian dengan air yang mengalir, setelah itu dikeringkan. Kemudian dirajang sampel menggunakan gunting, setelah itu dikeringkan sampel sampai benar-benar kering lalu dilakukan sortasi kering untuk memisahkan kotoran atau benda asing pada sampel setelah dikeringkan. Kemudian dihaluskan simplisia menjadi serbuk simplisia menggunakan blender.

Ekstraksi

1. Maserasi

Serbuk simplisia daun kemangi cina (*Spigelia anthelmia* L.) ditimbang sebanyak 90 gr serbuk, lalu sampel dimasukkan ke dalam wadah kaca dan ditambahkan sebanyak 1000 mL pelarut metanol sampai sampel tersebut terendam sempurna dengan sesekali dilakukan pengadukan. Proses ini dilakukan secara berulang-ulang atau remaserasi agar proses penarikan senyawa dapat berlangsung lebih sempurna. Ampas dan filtrat yang diperoleh kemudian dilakukan penyaringan dengan menggunakan kain saring sehingga menghasilkan filtrat metanol dan residu. Kemudian filtrat metanol yang didapatkan dikumpulkan didalam wadah dan dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* sampai mendapatkan ekstrak kental metanol.

2. Partisi Cair-Cair

Pertama dipartisi menggunakan pelarut N-Heksan dimana ekstrak kental metanol dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dicampurkan dengan N-Heksan (1:1) kemudian dikocok menggunakan *vortex* dan didiamkan sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi tidak larut N-Heksan (fraksi metanol) dan fraksi larut N-Heksan, kemudian disaring sehingga diperoleh fraksi larut N-Heksan dan fraksi tidak larut N-Heksan. Proses tersebut dilakukan secara berulang-ulang sampai fraksi larut N-Heksan yang

diperoleh benar-benar sudah tidak berwarna atau bening. Fraksi larut N-Heksan (fraksi metanol) dilanjutkan dengan dipartisi menggunakan pelarut etil asetat yang perbandingan pelarut dan sampelnya 1:1, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok menggunakan *vortex* dan didiamkan sehingga terbentuk 2 lapisan yaitu fraksi tidak larut etil asetat (fraksi metanol) dan fraksi larut etil asetat, kemudian disaring sehingga diperoleh fraksi larut etil asetat dan fraksi tidak larut etil asetat, proses tersebut dilakukan secara berulang-ulang sampai fraksi larut etil asetat yang di peroleh benar-benar sudah tidak berwarna atau bening. Fraksi tidak larut etil asetat dilanjutkan dengan dipartisi dengan pelarut metanol. Hasil dari masing-masing dari fraksi yang diperoleh dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga mendapatkan ekstrak kental.

Analisis Senyawa Metabolit Sekunder Dengan Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Plat KLT disiapkan dengan cara, dipotong plat silika $G_{60}F_{254}$ dengan ukuran 1x10 cm. Kemudian ditandai plat dengan pensil jarak 1 cm dari tepi bawah dan begitu juga pada bagian tepi atas, lalu diberi penanda garis dibagian bawah dan juga pada tepi atas. Setiap golongan senyawa memiliki campuran fase gerak yang berbeda. Setiap campuran fase gerak masukan kedalam gelas kimia lalu ditutup rapat dan dilakukan proses penjenuhan selama 60 menit.

Sampel yang telah di pekatkan menggunakan *rotary evaporator* kemudian ditotolkan pada plat silika yang telah di beri tanda garis dari tepi bawah menggunakan pipa kapiler. Sampel yang telah ditotolkan pada plat silika dimasukkan ke dalam gelas kimia untuk di elusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya yang telah di jenuhkan. Selanjutnya gelas kimia ditutup rapat selama 30 menit hingga fase geraknya mencapai jarak 1 cm dari tepi atas plat. Kemudian plat diangkat dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.

Noda atau bercak yang terbentuk pada plat KLT silika $G_{60}F_{254}$ disemprotkan dengan reagen penampak bercak dan di amati dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Pengamatan bercak yang dilakukan meliputi jumlah bercak, warna bercak dan jarak migrasi bercak dari tempat asalnya atau perhitungan nilai R_f (*Retardation factor*).

Uji Aktifitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,05 mM

Serbuk DPPH (BM 394,32) 0,0097 mg dilarutkan dengan metanol p.a kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, volumenya dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas (DPPH 0,05 mM). Larutan DPPH 0,05 mM dipipet 50 μ L, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dicukupkan dengan metanol p.a hingga tanda batas (DPPH 0,05 mM).

2. Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH 0,05 mM sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan metanol p.a sebanyak 2 ml, dikocok dengan *vortex* hingga homogen lalu dituang ke dalam kuvet dan diukur pada panjang gelombang 400- 800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

3. Pembuatan Larutan Blanko

Larutan DPPH 0,05 mM sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan metanol p.a sebanyak 2 mL, kemudian dikocok dengan *vortex* hingga homogen, diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit.

4. Pembuatan Larutan Vitamin C (Kontrol Positif)

Pembuatan larutan pembanding vitamin C dengan konsentrasi 1000 ppm dengan cara ditimbang 50 mg, lalu dilarutkan dengan metanol p.a. lalu 25 dimasukkan dalam labu ukur 50 mL, volume dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Pada pembuatan larutan serinya pada konsentrasi 5, 10, 15, 20, 25 ppm dengan cara dipipet 50, 100, 150, 200, 250 μ L, dan dimasukkan ke dalam vial lalu ditambahkan hingga 10 mL. Pengukuran serapan larutan uji pembanding dilakukan dengan cara diambil 2 mL dan dimasukkan ke dalam vial, kemudian ditambahkan larutan DPPH 0,05 mM sebanyak 2 mL, dikocok dengan *vortex* hingga homogen, dan diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap. Kemudian diukur pada panjang gelombang DPPH.

5. Pembuatan Larutan Uji Ekstrak Daun kemangi cina (*Spigelia anthelmia* L.)

- a. Pembuatan larutan induk 1000 ppm
Ekstrak daun Kemangi Cina (*Spigelia anthelmia* L.) ditimbang 50 mg, dilarutkan dengan methanol p.a lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, volume dicukupkan dengan methanol p.a sampai tanda batas.
- b. Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 5,10,15,20 dan 25 ppm
Larutan induk ekstrak daun Kemangi Cina (*Spigelia anthelmia* L.) masing-masing dipipet 50, 100, 150, 200, 250 (μ L), dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, volume dicukupkan dengan metanol p.a sampai tanda batas.
- c. Pengukuran serapan dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis
Larutan uji ekstrak daun kemangi cina (*Spigelia anthelmia* L.) sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan DPPH 0,05 mM sebanyak 2 mL, dikocok dengan *vortex* hingga homogen, diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selanjutnya, serapan diukur pada panjang gelombang 516 nm.

Penentuan Persen Inhibisi

Data hasil absorbansi masing-masing sampel digunakan untuk mencari % inhibisinya. Menurut [14], rumus untuk mencari % inhibisi adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Keterangan:

Ablanko = absorbansi pada DPPH tanpa sampel

Asampel = absorbansi pada DPPH setelah ditambah sampel

Hasil perhitungan dimasukkan dalam persamaan linier dengan persamaan

$$Y = aX + b$$

Keterangan :

Y = % inhibisi

a = Gradien

X = konsentrasi (μ g/ml)

b = Konstanta

Penentuan Nilai IC₅₀ (Inhibitory Concentrations)

Persaman liner yang dihasilkan digunakan untuk memperoleh nilai IC₅₀. Nilai IC₅₀ merupakan konsentrasi yang diperoleh pada saat % inhibisi sebesar 50 dari persamaan Y= aX + b. Pada saat % inhibisi = 50, maka rumus untuk menghitung nilai IC₅₀ persamannya menjadi :

$$50 = ax + b \times \frac{50-b}{a} x$$

Harga X adalah IC₅₀ dengan satuan µg/ml [15].

Validasi Data

Validasi data yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

1. Akurasi

$$\% \text{ perolehan kembali} = \frac{\text{Kadar Hasil Analisis}}{\text{Kadar sesungguhnya}} \times 100\% \quad [13]$$

2. Presisi

$$\text{Standar Deviasi} = \frac{\sqrt{\sum (X - \bar{X})^2}}{n-1} \times 100\% \quad [13]$$

3. LOD dan LOQ

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{S} \quad [13]$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \times \sigma}{S} \quad [13]$$

4. Linearitas

$$Y = bx + a \quad [13]$$

Keterangan :

- X = nilai masing-masing
- N = frekuensi penetapan
- X = rata - rata (mean) pengukuran
- N - 1 = derajat kebebasan
- Q = batas LOD dan LOQ
- SI = arah garis linear
- σ = simpangan baku respon analitik dari blanko
- S = Slope (b pada persamaan garis y = bx + a)
- K = 3 untuk batas deteksi (LOD), 10 untuk batas kuantitas (LOQ)
- y = luas area puncak
- b = slope
- x = konsentrasi sampel
- a = intersep

3. Hasil dan Pembahasan
Ekstrak Daun *Spigelia anthelmia* L.

Tabel 1. Hasil rendamen yang diperoleh

Berat Sampel (g)	Volume Pelarut (mL)	Berat Ekstrak (g)	Rendamen (%)
90	3000 mL	12,9	14,33%

Pada tabel 1 menunjukkan hasil ekstraksi sampel 90 gr daun *Spigelia anthelmia* L. menggunakan pelarut metanol sebanyak 3000 mL. Ekstrak kental yang didapatkan seberat 12,9 gr dengan jumlah persen rendamen sebanyak 14,33%. Presentasi rendamen yang baik menurut Dirjen POM [4] yakni 10% - 15%. Hal ini menandakan bahwa proses ekstraksi berlangsung sempurna.

Partisi Cair-Cair Ekstrak Daun *Spigelia anthelmia* L.

Metode partisi cair-cair sesuai dengan metode pemisahan menurut Martina [5], dimana metode ekstraksi yang didasarkan pada sifat kelarutan komponen suatu senyawa dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur. Metode ini juga digunakan karena keuntungannya dimana prosesnya sederhana, biaya yang murah serta cocok untuk bahan yang tidak tahan panas atau mudah menguap [6]. Pada pengujian ini menggunakan tiga fase gerak yakni 4:1 metanol : n-heksan, 1:4 etil asetat : n-heksan dan 4:1 etil asetat : n-heksan. Pemilihan ketiga jenis pelarut ini berdasarkan perbedaan sifat kepolarannya sehingga bisa memisahkan senyawa pada sampel yang bersifat polar, semi polar, dan non polar.

Tabel 2. Hasil Partisi Cair-Cair

Ekstrak	Berat Akhir (gram)
Fraksi N-Heksan	1,955
Fraksi Etil Asetat	0,316
Fraksi Metanol	2,654

Berdasarkan tabel 2 menunjukkan bahwa pada ketiga fraksi diperoleh berat akhir untuk fraksi n-heksan sebanyak 1,955 gram, fraksi etil asetat sebanyak 0,316 gram, dan fraksi metanol sebanyak 2,654 gram.

Hasil Uji Kualitatif Menggunakan Metode KLT

Identifikasi dengan Kromatografi lapis tipis dilakukan dengan tujuan untuk melihat pola kromatogram komponen senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun *Spigelia anthelmia L.* Pada metode kromatografi lapis tipis ini dilakukan dengan prinsip *trial and error* dimana prinsip ini digunakan untuk mencari eluen dengan perbandingan tertentu yang dapat memberikan pemisahan yang baik.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun *Spigelia anthelmia L.* dengan Pereaksi Semprot

Sampel	Fase Gerak	UV 254 nm	UV 366 nm	Nilai Rf
Ekstrak metanol	Metanol:N-Heksan (4:1)	Adanya bercak noda	(+) Alkaloid	0,17
	Etil Asetat:N-Heksan (4:1)		(+) Terpenoid	0,8; 0,7; 0,55
Fraksi n-heksan	Metanol:N-Heksan (4:1)	Adanya bercak noda	(+) Flavonoid	0,8
	Etil Asetat:N-Heksan (4:1)		(+) Terpenoid	0,8; 0,71; 0,7; 0,55; 0,33
	N-Heksan:Etil Asetat (4:1)			
Fraksi etil asetat	Metanol:N-Heksan (4:1) Etil Asetat:N-Heksan (4:1)	Adanya bercak noda	(+) Flavonoid	0,66

	N-Heksan:Etil Asetat (4:1)		(+) Terpenoid	0,8; 0,71; 0,7; 0,55
Fraksi metanol	Etil Asetat:N-Heksan (4:1)	-	(+) Alkaloid	0,17

Menurut Sari [7], fungsi dari pereaksi $AlCl_3$ adalah untuk membentuk reaksi antara $AlCl_3$ dengan golongan flavonoid membentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang bertetangga atau dengan gugus hidroksil yang saling bertetangga. $AlCl_3$ akan bereaksi dengan gugus keton pada C4 dan gugus OH pada C3 atau C5 pada senyawa flavon atau flavonol membentuk senyawa kompleks yang stabil berwarna kuning.

Pada uji alkaloid setelah disemprotkan dengan dragendroff menghasilkan bercak noda berwarna orange yang menunjukkan hasil positif, karena pada uji alkaloid setelah disemprotkan dragendroff akan menunjukkan bercak noda warna coklat jingga berlatar belakang kuning. Hal ini disebabkan karena terjadinya pergantian ligan dimana nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid (berwarna coklat).

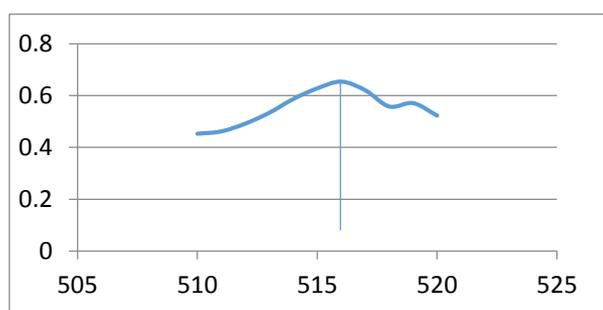
Dari hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *Spigelia anthelmia* L. mengandung senyawa metabolit sekunder yaitu positif senyawa alkaloid setelah disemprotkan dengan dragendroff menghasilkan bercak noda berwarna orange dengan nilai R_f 0,17. Menurut Harbone [8] nilai R_f alkaloid yang paling umum yaitu 0,07-0,62 dengan melihat hasil identifikasi dengan pereaksi kimia. Positif senyawa flavonoid dengan bercak noda berpendar kuning pada fraksi etil asetat dengan nilai R_f 0,66 dan 0,8 dalam hal ini menurut Mustapa et al [9] nilai R_f flavonoid berkisar pada range 0,69-0,81, dan positif terpenoid dimasing-masing eluen dengan bercak noda berwarna merah pada ekstrak metanol, fraksi n-heksan dan etil asetat hal ini didukung dengan nilai R_f yang didapatkan 0,33; 0,55; 0,7; 0,71 dan 0,8 pada penelitian Yusuf [10] range nilai R_f terpenoid yaitu 0,2 - 0,8 yang ditandai dengan terbentuknya warna merah jingga atau violet.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Pada pengujian aktifitas antioksidan secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Pemilihan menggunakan metode ini mudah diterapkan karena senyawa radikal DPPH yang digunakan bersifat relatif stabil dibanding dengan metode lainnya. Metode DPPH ini tergolong metode yang sederhana, mudah, cepat dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel untuk evaluasi aktifitas antioksidan dari senyawa bahan alam [10].

Prinsip pengukuran aktifitas antioksidan secara kuantitatif menggunakan metode DPPH adalah adanya perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa difenil pikril hidrazin dan menyebabkan terjadinya perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini mengakibatkan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktifitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai Inhibitory concentration (IC_{50}) [10].

Preparasi untuk larutan blanko dilakukan untuk menentukan panjang gelombang maksimum dari senyawa DPPH menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Panjang gelombang yang digunakan yaitu 516 nm. Radikal DPPH memiliki warna komplementer ungu dan memberikan serapan maksimum pada panjang gelombang 515 - 520 nm [11].



Gambar 1. Hasil Absorbansi Ekstrak Daun *Spigelia anthelmia* L.

Untuk meningkatkan akurasi dari data yang akan didapatkan maka, pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali (triplo). Pada ekstrak metanol didapatkan hasil persen inhibisi pada masing-masing variasi sampel yakni 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 39,9592%; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 44,7502%; 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 53,4658%; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 63,6595%; dan 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 69,7247%. Hal ini menunjukkan adanya peningkatan aktivitas dalam penghambatan radikal bebas seiring dengan bertambahnya konsentrasi sampel ekstrak metanol. Dari persamaan regresi linear berdasarkan log konsentrasi terhadap persen inhibisi dengan persamaan $y = 1,568x + 30,78$ dan $r^2 = 0,987$, dimana nilai r^2 menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap sampel, dari data tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 12,24 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pada fraksi n-heksan didapatkan hasil persen inhibisi pada masing-masing variasi sampel yakni 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 19,9796 %; 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 29,9694 %; 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 38,5321 %; 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 41,5392 %; dan 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sebesar 51,2742 %. Dari persamaan regresi linear berdasarkan log konsentrasi terhadap persen inhibisi dengan persamaan $y = 1,483x + 14,01$ dan $R^2 = 0,976$, dimana nilai R^2 menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap sampel, dari data tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 24,26 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Pada fraksi etil asetat didapatkan hasil persen inhibisi pada masing-masing variasi sampel yakni 5 µg/ml sebesar 23,1396 %; 10 µg/ml sebesar 26,3506 %; 15 µg/ml sebesar 37,0030 %; 20 µg/ml sebesar 44,5973 %; dan 25 µg/ml sebesar 49,7451 %. Dari persamaan regresi linear berdasarkan log konsentrasi terhadap persen inhibisi dengan persamaan $y = 1,429x + 14,73$ dan $R^2 = 0,977$, dimana nilai R^2 menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap sampel, dari data tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 24,01 µg/ml.

Pada fraksi metanol didapatkan hasil persen inhibisi pada masing-masing variasi sampel yakni 5 µg/ml sebesar 47,5535 %; 10 µg/ml sebesar 53,0581 %; 15 µg/ml sebesar 55,3516 %; 20 µg/ml sebesar 61,4169 %; dan 25 µg/ml sebesar 66,5647 %. Dari persamaan regresi linear berdasarkan log konsentrasi terhadap persen inhibisi dengan persamaan $y = 0,927x + 42,87$ dan $R^2 = 0,985$, dimana nilai R^2 menunjukkan bahwa ada pengaruh yang signifikan perlakuan terhadap sampel, dari data tersebut didapatkan nilai IC_{50} sebesar 7,69 µg/ml.

Pada kontrol positif didapatkan hasil persen inhibisi yakni 5 µg/ml sebesar 48,7524 %; 10 µg/ml sebesar 52,5449 %; 15 µg/ml sebesar 59,2814 %; 20 µg/ml sebesar 64,5209 % dan 25 µg/ml sebesar 68,9121 %. Menurut Penelitian Rahayu [11], persen aktivitas antioksidan merupakan salah satu parameter yang menunjukkan kemampuan suatu antioksidan dalam menghambat radikal bebas.

Hasil Absorbansi Ekstrak Daun *Spigelia anthelmia* L.

Table 4. Hasil Absorbansi Ekstrak Daun *Spigelia anthelmia* L.

No	Bahan	Konsentrasi teoritis (µg/ml)	Absorbansi			Aktivitas Hambatan (%)	Persamaan Linear	Nilai IC_{50} (µg/ml)
1	ekstrak metanol	5	0,391	0,394	0,393	39,95	$y = 1,568x + 30,78$ $r = 0,974$ $r^2 = 0,987$	12,24
		10	0,361	0,362	0,361	44,75		
		15	0,303	0,305	0,305	53,46		
		20	0,237	0,239	0,237	63,65		
		25	0,198	0,199	0,199	69,72		
2	Fraksi metanol	5	0,342	0,344	0,343	47,55	$y = 0,027x + 42,83$ $r = 0,966$ $r^2 = 0,983$	7,69
		10	0,305	0,307	0,309	53,05		
		15	0,291	0,293	0,292	55,35		
		20	0,252	0,253	0,252	61,41		
		25	0,219	0,219	0,218	65,56		
3	Fraksi n-heksan	5	0,521	0,526	0,523	19,97	$y = 1,483x + 14,01$ $r = 0,952$ $r^2 = 0,976$	24,26
		10	0,458	0,459	0,457	29,96		
		15	0,401	0,403	0,402	38,53		
		20	0,382	0,383	0,382	41,53		
		25	0,319	0,319	0,318	51,27		
4	Fraksi etil	5	0,501	0,503	0,503	23,13	$y = 1,429x + 14,73$	24,01
		10	0,481	0,481	0,483	26,35		

asetat	15	0,411	0,413	0,412	37,00	$r = 0,954$	
	20	0,362	0,363	0,362	44,59	$r^2 = 0,977$	
	25	0,329	0,329	0,328	49,74		
5 Vitamin C	5	0,342	0,343	0,342	48,75	$y = 1,045x$	6,59
	10	0,315	0,317	0,319	52,54	$+ 43,11$	
	15	0,271	0,273	0,272	59,28	$r = 0,976$	
	20	0,237	0,238	0,236	64,52	$r^2 = 0,993$	
	25	0,208	0,208	0,207	68,91		

Nilai IC_{50} merupakan salah satu parameter yang digunakan dalam menunjukkan aktivitas antioksidan dimana menunjukkan konsentrasi suatu zat antioksidan yang dapat menyebabkan 50% atau setengah konsentrasi dari radikal bebas (DPPH). Menurut Parkash [11] bahwa penggolongan sifat antioksidan IC_{50} yaitu <50 dikategorikan sangat kuat, 50-100 kuat, 100-150 sedang dan 150-200 lemah. Pada hasil uji keempat ekstrak diperoleh Nilai IC_{50} dimana fraksi metanol yakni 7,69 ug/ml, fraksi n-heksan yakni 24,26 ug/ml, fraksi etil asetat 24,01 ug/ml dan ekstrak metanol yakni 12,24 ug/ml, sedangkan untuk kontrol positif yakni vitamin C didapatkan nilai IC_{50} yakni sebesar 6,59 ug/ml. Dari keempat ekstrak diatas dapat dilihat bahwa fraksi metanol memiliki penghambat antioksidan yang paling baik berhubungan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder yang dikandungnya, flavonoid merupakan antioksidan eksogen yang mengandung gugus fenolik dan telah dibuktikan bermanfaat dalam mencegah kerusakan sel akibat stress oksidatif. Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan adalah dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menstabilkan radikal bebas yang reaktif dan bertindak sebagai scavenger/penangkal radikal bebas [11].

Validasi Data

1. Presisi

Presisi merupakan ukuran tingkat keterulangan metode analisis yang ditampilkan dalam simpangan baku relatif dari sampel yang berbeda secara signifikan secara statistik. Hasil absorbansi yang diperoleh digunakan untuk menghitung Standar Deviasi (SD) dan RSD (*Relative Standard Deviation*) [12]. Pada uji presisi dilakukan pada larutan DPPH yang dilihat absorbansinya sebanyak 6 kali didapatkan RSD (*Relative Standard Deviation*) atau standar deviasi relatif sebesar 0,211392167 %, dimana menurut Harmita, persyaratan untuk nilai SD < 2 sehingga menunjukkan bahwa uji presisi masuk dalam kriteria penilaian nilai SD.

Tabel 5. Uji Presisi

DPPH 0,05 mM	Absorbansi
1	0,669
2	0,669
3	0,668
4	0,670
5	0,670

6	0,668
AVE	0.669
SD	0,0014142136
RSD(%)	0,211392167

2. LOD, LOQ, & Linearitas (Vit C Metode DPPH)

Batas deteksi (*Limit of Detection*, LOD) merupakan konsentrasi analit yang masih dapat terdeteksi walaupun tidak selalu dapat dikuantifikasi. Sedangkan Batas kuantifikasi (*Limit of Quantification*, LOQ) merupakan konsentrasi analit terendah dari sampel yang dapat ditentukan dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima pada kondisi operasional metode yang digunakan. Batas deteksi (LOD) dan batas kuantitas (LOQ) dapat dihitung secara statistik melalui persamaan regresi linier dari kurva standar [12]. Dari hasil perhitungan didapatkan bahwa batas deteksi yakni 0,051512 mg/L dan batas kuantitas adalah 0,156097 mg/L.

Tabel 6. Hasil Uji Linearitas, LOD dan LOQ

Konsentrasi (µg/ml)	Absorbansi	% Inhibisi	Kons diketahui (µg/ml)	%Recovery
5	0.342	49.42	5,397129	107,9425
10	0.317	54.42	9,023923	90,2392
15	0.272	64.66	15,473684	103,1578
20	0.237	80.64	20,488038	102,4401
25	0.177	84.29	24,688995	98,7559
			<i>Average</i>	100,5071
			<i>SE of intercept</i>	0,008774964
			<i>SD of intercept</i>	0,019621417
			LOD*	0,051512073
			LOQ*	0,156097191

Uji linearitas dapat dilakukan dengan menghitung secara statistik melalui koefisien korelasi dari konsentrasi dan absorbansi larutan baku [12]. Linearitas dapat tercapai apabila nilai koefisien korelasi (r) semakin mendekati 1 ($r = +1$ atau $r = -1$). Nilai r yang mendekati 1 menandakan hubungan antara linier antara konsentrasi analit dengan absorbansi yang terukur. Pada kontrol positif yakni vitamin C dilakukan uji linearitas, Untuk nilai persamaan linearitasnya didapatkan persamaan $y = 1,045x + 43,11$ dengan nilai $R^2 = 0.993$ serta nilai $r = 0.986$. Menurut Harmita [13], nilai r sebagai syarat koefisien korelasi yakni $\geq 0,900$.

Tabel 7. Hasil Uji Akurasi

	Konsentrasi µg/ml	Σ Absorbansi	% Inhibisi	Konsentrasi diketahui	% Recovery
Ekstrak	5	0,3926	39,9592	5,8482	116,3364
Metanol	10	0,3613	44,7502	8,9094	89,0940
	15	0,3043	53,4658	14,4642	96,4280
	20	0,2376	63,6595	20,9630	104,8150

	25	0,1980	69,7247	24,8341	99,3664
	Average				101,3274
	Konsentrasi	Σ Absorbansi	% Inhibisi	Konsentrasi Diketahui	% Recovery
Fraksi n- heksan	5	0,5233	19,9796	4,0188	105,2847
	10	0,4580	29,9641	10,7552	94,96897
	15	0,4020	38,5321	16,5340	110,2266
	20	0,3823	41,5392	18,5569	107,5520
	25	0,3186	51,2742	25,1247	80,3760
	Average				98,2875
	Konsentrasi	Σ Absorbansi	% Inhibisi	Konsentrasi Diketahui	% Recovery
Fraksi etil asetat	5	0,5026	23,1396	5,8782	117,5640
	10	0,3623	26,3506	8,1315	81,3150
	15	0,4120	37,0030	15,5843	103,8953
	20	0,4816	44,5973	20,8957	104,4785
	25	0,3286	49,7451	24,4996	97,9984
	Average				101,0502
	Konsentrasi	Σ Absorbansi	% Inhibisi	Konsentrasi Diketahui	% Recovery
Fraksi metanol	5	0,3430	47,5535	5	101,0460
	10	0,3070	53,0581	10,9816	109,8160
	15	0,2920	55,3516	13,4627	89,7513
	20	0,2523	61,4169	20	100
	25	0,2186	66,5647	25,5339	102,1356
	Average				100,5478
	Konsentrasi	Σ Absorbansi	% Inhibisi	Konsentrasi Diketahui	% Recovery
Vitamin C	5	0,3423	48,7524	5,3971	107,9425
	10	0,3170	52,5449	9,0239	90,2392
	15	0,2720	59,2814	15,4736	103,1578
	20	0,2370	64,5209	20,4880	102,4409
	25	0,2076	68,9121	24,6889	98,7559
	Average				100,5071

Berdasarkan data yang diperoleh didapatkan hasil % *recovery* pada fraksi metanol sebesar 101,3274 %, pada fraksi N-heksan sebesar 98,2875 %, pada fraksi etil asetat sebesar 101,0502 %, pada fraksi metanol sebesar 100,5478 %, dan 100,5071 % pada vitamin C. Hal ini jika dibandingkan dengan persyaratan menurut Harmita [13], yakni berkisar antara 98 % - 102 %. Dari persyaratan tersebut dapat diartikan bahwa nilai uji perolehan kembali % *Recovery* dikatakan baik karena masuk dalam kriteria syarat. Menurut Harmita [13], syarat uji validasi sebagai berikut:

Tabel 8. Syarat Uji Validasi

Parameter	Syarat	Keterangan
Akurasi	98 - 102 %	Memenuhi syarat
Presisi	SD < 2	Memenuhi syarat
Linearitas	$r^2 \geq 0.9000$	Memenuhi syarat
Batas Deteksi	-	-
Batas Kuantitas	-	-

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa: Daun *Spigelia anthelmia* L. positif senyawa alkaloid setelah disempatkan dengan dragendroff menghasilkan bercak noda berwarna orange dengan nilai Rf 0,17. Positif senyawa flavonoid yang menunjukkan bercak noda berpendar kuning dengan nilai Rf 0,66 dan 0,8 dan positif terpenoid dengan bercak noda berwarna merah dengan nilai Rf yang didapatkan 0,33; 0,55; 0,7; 0,71 dan 0,8.

Ekstrak yang memiliki aktifitas antioksidan paling besar yakni pada Fraksi metanol dengan nilai IC₅₀ sebesar 7,69 µg/ml dan pada ekstrak metanol sebesar 12,24 µg/ml yang mengandung senyawa alkaloid, fraksi n-heksan sebesar 24,26 µg/ml yang mengandung senyawa terpenoid dan fraksi etil asetat sebesar 24,01 µg/ml yang mengandung senyawa flavonoid.

Referensi

- [1] Adikara, I Putu Arya, Dkk. 2013. *Studi Histopatologi Hati Tikus Putih (Rattus Novergicus) Yang Diberi Ekstrak Etanol Daun Kedondong (Spondias Dulcis) Secara Oral. Buletin Veteriner Udayana*. ISSN: 2085-2495. Vol. 5 No. 2.
- [2] Nelson, L.S., Shih, R, D. Balick M.J. & Lampe. K.F., 2007. *Handbook Of Poisonous And Injurious Plants*, springer.
- [3] Duke, J.A. 2010. *Handbook Of Medicinal Herb*. CRC.
- [4] Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. DepKes RI, Jakarta. Halaman 3-5, 13-17, 30-31.
- [5] Martina, R. 2018. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Ekstrak Metanol Sponge Aaptos sp*. Bandar Lampung: Universitas Lampung.
- [6] Setiawan, I. 2010. *Optimasi Ekstrak Cair Cair Fraksi Etanol Daun Dandang Gendis (Clinacanthus mutans)*. Bandung: IPB.

- [7] Sari, Dkk. 2017. *Analisis Kualitatif Merkuri Pada Lotion Pemutih Yang Dijual Di Online Shop Daerah Kota Banjarmasin*. Jurnal Ilmiah Ibnu Sina. Banjarmasin .Vol 2 No 1. Hal. 13-19.
- [8] Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan K. Padmawinata & I. Soediro, Penerbit ITB; Bandung.
- [9] Mustafa R., Albadri, Ahmed A., dan Abdulelah, Furqan M. (2019). *Nanoemulsion Preparation, Identification and Evaluation Review*. Journal of Global Pharma Technology. 196-208
- [10] Yusuf, Sumarno, 2010, *Pengaruh Penambahan Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.) dan Perebusan terhadap Residu Formalin dan Profil Protein Udang Putih (Letapenaeusa vannamei) Berformalin serta Pemanfaatannya sebagai Sumber Pendidikan Gizi dan Keamanan Pangan pada Masyarakat, Surabaya, Pasca Sarjana FK UB*.
- [11] Prakash, A. 2001. *Antioxidant Activity*. Journal Of Analytical Chemsitry. Medallion Laboratories: Analytical Progress. Vol 10, No. 2
- [12] Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- [13] Harmita. 2004. *Petunjuk Pelaksanaan Validasi Metode dan Cara Perhitungannya*. Fakultas Farmasi: Universitas Indonesia.
- [14] Ghosal, M & Mandal, P. 2012. *Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Two Selected 'Bihi' Fruits Used as Vegetables in Darjeeling Himalaya*. International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences. ISSN: 0975-1491.
- [15] Nurjanah, Izzati, L. & Abdullah, A. 2011. *Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Kerang Pisau (Solen spp)*. Bogor: Universitas Diponegoro. ISSN: 0853-7291.