

Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Dan Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D.C) Dengan Metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Nuning Nurhayati^{a,1}, Fadilah Qonitah^{a,2*}, Ahwan^{a,3}

^aProgram Studi Farmasi, Fakultas Sains Teknologi dan Kesehatan, Universitas Sahid Surakarta, Jl. Adi Sucipto No. 154, Jajar, Laweyan, Surakarta, Jawa Tengah 57144

¹nuningnur76@gmail.com; ²fadilahqonitah@usahidsolo.ac.id*; ³ahwan@usahidsolo.ac.id

*korespondensi penulis

INFO ARTIKEL	ABSTRAK
<p>Diterima : 24-01-2022 Direvisi : 28-01-2022 Disetujui : 28-01-2022</p> <p>Kata kunci: FRAP; antioksidan; fraksi n-heksan; fraksi kloroform; daun jeruk purut.</p>	<p>Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menyeimbangkan ROS (<i>reactive oxygen species</i>) yang dapat menyebabkan penuaan kulit. Tubuh manusia secara alamiah dapat menghasilkan antioksidan akan tetapi jumlahnya terbatas sehingga perlu antioksidan eksogen. Daun jeruk purut merupakan tanaman yang mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan alami. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut dengan metode FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>). Metode ekstraksi menggunakan maserasi dengan pelarut etanol 96%. Fraksinasi menggunakan metode partisi dilanjutkan uji aktivitas antioksidan dengan metode FRAP secara spektrofotometri <i>UV-Vis</i>. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi kloroform memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai EC_{50} masing-masing sebesar $(9870,36 \pm 1,55) \mu\text{g/mL}$ dan $(9713,30 \pm 0,70) \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut mempunyai aktivitas antioksidan yang sangat lemah.</p>
<p>Key word: FRAP; antioxidants; n-hexane fraction; chloroform fraction; lime leaves.</p>	<p>ABSTRACT</p> <p>Antioxidants are compounds that can balance ROS (<i>reactive oxygen species</i>) which can cause skin aging. The human body can naturally produce antioxidants but the amount is limited so it needs exogenous antioxidants. Kaffir lime leaves are plants that contain phenolic and flavonoid compounds that have the potential as antioxidants. This study aims to determine the antioxidant activity of the n-hexane fraction and the chloroform fraction of ethanol extract of kaffir lime leaves using the FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>) method. The extraction method uses maceration with 96% ethanol as solvent. Fractionation using partition method followed by antioxidant activity test using FRAP method by <i>UV-Vis</i> spectrophotometry. The results showed that the n-hexane and the chloroform fractions had antioxidant activity with EC_{50} values of $(9870.36 \pm 1.55) \text{ g/mL}$ and $(9713.30 \pm 0.70) \text{ g/mL}$. Based on the results of the study, it can be concluded that the n-hexane fraction and the chloroform fraction of the ethanol extract of kaffir lime leaves had very weak antioxidant activity.</p> <p>This is an open access article under the CC-BY-SA license.</p> 

Pendahuluan

Penuaan kulit dapat terjadi secara intrinsik maupun ekstrinsik. Penuaan kulit intrinsik terjadi secara alami seiring bertambahnya usia yang dipengaruhi oleh jenis kelamin, ras, hormon dan sebagainya. Sedangkan penuaan kulit ekstrinsik dapat

dipengaruhi oleh salah satunya paparan sinar matahari atau *photoaging* (Stojiljković *et al.*, 2014).

Proses penuaan kulit tersebut dapat terjadi karena akumulasi dari stress oksidatif yang merusak sel kulit. Stress oksidatif dapat terjadi karena ketidakseimbangan antara ROS (*reactive oxygen species*) dan antioksidan yang ada di dalam tubuh. ROS

(*reactive oxygen species*) merupakan senyawa turunan oksigen sebagai pengoksidasi yang sangat reaktif. Jumlah ROS yang tinggi dapat mengakibatkan terjadinya formasi peroksinitris sehingga dapat terjadi kematian sel (Zuhria *et al.*, 2017).

Jumlah ROS yang tinggi didalam tubuh dapat diseimbangkan oleh antioksidan endogen yang seperti glutation, piruvat, dan lycopene. Akan tetapi jika antioksidan endogen tidak dapat menyeimbangkan ROS maka diperlukan antioksidan eksogen yang berasal dari luar tubuh. Antioksidan eksogen dapat diperoleh dari antioksidan sintetik maupun antioksidan alami yang dapat bersumber dari tanaman (Zuhria *et al.*, 2017)

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antioksidan adalah jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C). Daun jeruk purut banyak mengandung senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid polifenol, d{okoferol, minyak atsiri, tannin, steroid triterpenoid, sitronelal, flavanoid sianidid, myricetin, peonidin, quercetin, luteolin, hesljeretin, apigenin, dan isorhanrnetin (Qonitah *et al.*, 2020). Senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun jeruk tersebut dapat berperan aktif sebagai antioksidan (Abd. Ghafar *et al.*, 2010).

Penelitian yang dilakukan oleh Qonitah & Ahwan (2019) melaporkan bahwa fraksi kloroform dan n-heksan ekstrak etanol daun jeruk purut mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH masing-masing dengan nilai IC_{50} sebesar $(302.91 \pm 0.28) \mu\text{g} / \text{mL}$ dan $(714,25 \pm 1,97) \mu\text{g} / \text{mL}$. Sedangkan kandungan fenolik total masing-masing fraksi tersebut masing-masing sebesar $4.73 \pm 0,33\% \text{ b/b EAG}$ dan $(3,18 \pm 0,31\% \text{ b/b EAG})$.

Berdasarkan informasi tersebut belum pernah dilakukan uji aktivitas antioksidan fraksi kloroform dan n-heksan daun jeruk purut dengan metode FRAP. Oleh karena itu peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform dan n-heksan ekstrak etanol daun jeruk purut dengan menggunakan metode FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*).

Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas (pyrex), neraca analitik (acys), mortir (lokal), pisau (lokal), kertas saring, corong buchner *rotary evaporator vacuum* (bio base), corong pisah (pyrex), desikator, oven (marnert) dan spektrofotometer *UV-Vis* (Genesys I0S).

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C), aquades (*pt. brataco*), kloroform (CHCl_3) (merk), n-heksan (merk), standar vitamin C, HCl, etanol 96 % (medika), methanol pa, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, buffer asetat, TPTZ dan FeSO_4 (besi II) sulfat.

Jalannya Penelitian

Penyiapan Sampel

Simplisia daun jeruk purut yang telah diserbuk sebanyak 800 gr kemudian dimaserasi dengan menggunakan 4 liter etanol 96%. Campuran didiamkan selama 3x24 jam, setelah itu disaring. Maserat hasil dari ekstraksi dievaporasi dengan *rotary evaporatory* pada suhu 60°C hingga mendapatkan ekstrak kental daun jeruk purut. Ekstrak etanol daun jeruk yang diperoleh kemudian dipartisis dengan corong pisah menggunakan pelarut n-heksan dan kloroform sehingga diperoleh fraksi n-heksan dan fraksi kloroform (Qonitah & Ahwan, 2019).

Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode FRAP

Pembuatan Buffer Asetat

Buffer Asetat dengan pH 3,6 dibuat dari 0,775 gram natrium asetat trihidrat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) yang ditambahkan dengan 4 mL asam asetat pekat dan dilarutkan dengan aquadest hingga tepat 250 mL dalam labu takar (Samosir *et al.*, 2012)

Pembuatan Larutan 10 mmol/L 2,4,6-tripyridil-striazine (TPTZ)

Sebanyak 31 mg TPTZ dilarutkan dalam 40 mmol/L HCl hingga tepat 10 mL. Larutan 40 mmol/L dibuat dengan melarutkan $380 \mu\text{L}$ HCl pekat dalam 100 mL aquades (Samosir *et al.*, 2012).

Pembuatan Larutan 20 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

Sebanyak 32,44 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dengan buffer asetat dalam labu takar hingga tepat 10 mL (Samosir *et al.*, 2012)

Pembuatan Reagen FRAP

Reagen FRAP dibuat dengan cara mencampurkan 25 mL buffer asetat, 2,5 mL larutan TPTZ dan 2,5 larutan $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, lalu ditambahkan aquadest hingga tepat 100 mL dalam labu takar (Samosir *et al.*, 2012)

Pembuatan Larutan Standart FeSO_4

Larutan stok 1000 ppm FeSO_4 dibuat dengan melarutkan 100 mg FeSO_4 dalam 100 mL aquadest. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 100-1000 $\mu\text{mol/L}$ (Samosir *et al.*, 2012)

Uji Aktivitas Antioksidan

Beberapa seri konsentrasi 100-1000 μmL yang telah dibuat ditambah 3 mL FRAP dan etanol pa hingga 5,0mL. Campuran divortek 30 detik dan diinkubasi selama *operating time* (30 menit). Lalu

dibaca pada setiap panjang gelombang dalam kisaran 588-598 nm dengan menggunakan spektrofotometer visible (Samosir *et al.*, 2012)

Besarnya aktivitas antioksidan dinyatakan dalam EC_{50} yang perhitungannya diperoleh dari data absorbansi terhadap pengenceran seri konsentrasi Ferrous Sulfat ($FeSO_4$) dan dicatat setara dengan μM Fe^{2+} (Karim *et al.*, 2014)

Hasil dan Pembahasan

Pada penelitian ini aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut ditentukan dengan metode FRAP. Pemilihan metode tersebut karena prosedur kerjanya yang sederhana, murah, cepat tidak perlu alat khusus dalam menghitung total antioksidan serta reagen yang dipakai cukup sederhana (Maryam *et al.*, 2016)

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP didasarkan pada kemampuan senyawa antioksidan untuk mereduksi ion Fe^{3+} TPTZ menjadi Fe^{2+} TPTZ yang ditandai dengan perubahan warna biru intensif dalam suasana asam (Irma & Suryanto, 2019). Metode FRAP digunakan untuk mengukur kekuatan senyawa antioksidan dalam mereduksi $Fe(III)$ -TPTZ menjadi $Fe(II)$ -TPTZ dan terjadi perubahan warna dari kuning ke biru. TPTZ sendiri merupakan *colorants* dan $Fe(III)$ merupakan radikal bebas. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode FRAP dilakukan pada pH asam dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 593 nm (Boligon, 2014).

Pada penelitian ini pengujian aktivitas antioksidan dilakukan pada panjang gelombang maksimal 595 nm dengan spektrofotometer *UV-Vis*. Selain itu absorbansi sampel juga diukur pada OT (*operating time*) selama 30 menit untuk mendapatkan absorbansi yang stabil.

Besarnya aktivitas antioksidan pada sampel ditentukan berdasarkan kurva baku $FeSO_4$ dan diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,005x + 0,1609$ dengan nilai $R^2 = 0,996$. Selanjutnya data absorbansi sampel dimasukkan ke persamaan kurva baku tersebut untuk mengetahui besarnya aktivitas antioksidan. Besarnya aktivitas antioksidan dalam penelitian ini diinterpretasikan dalam konsentrasi efektif pada 50% (EC_{50}) dari nilai FRAP yaitu konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mereduksi 0,5 mol Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} (Karim *et al.*, 2014).

Tabel I. Aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut dengan metode FRAP

Sampel	Nilai EC_{50} ($\mu g/mL$)			Rata-rata ($\mu g/mL$)
	RI	R2	R3	
Vit C	133,75	134,68	136,23	$134,89 \pm 1,25$

Fraksi n-heksan	9869,26	9871,46	9879,95	$9870,36 \pm 1,55$
Fraksi kloroform	9712,80	9708,62	9713,79	$9713,30 \pm 0,70$

Berdasarkan tabel I menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut mempunyai aktivitas antioksidan dengan masing-masing nilai EC_{50} sebesar ($9870,36 \pm 1,55$) $\mu g/mL$ dan ($9713,30 \pm 0,70$) $\mu g/mL$. Hal ini berarti bahwa konsentrasi efektif dari fraksi n-heksan dan fraksi kloroform yang diperlukan untuk mereduksi 0,5 mol Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} masing-masing sebesar ($9870,36 \pm 1,55$) $\mu g/mL$ dan ($9713,30 \pm 0,70$) $\mu g/mL$. Berdasar hasil tersebut berarti bahwa kemampuan senyawa antioksidan yang ada dalam fraksi kloroform untuk mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} lebih besar daripada fraksi n-heksan sehingga aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform lebih besar daripada fraksi n-heksan.

Aktivitas antioksidan yang dimiliki fraksi n-heksan dan fraksi kloroform tersebut termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan sangat lemah karena nilai EC_{50} nya >500 $\mu g/mL$. Suatu sampel mempunyai nilai $EC_{50} < 50$ $\mu g/mL$ maka aktivitas antioksidannya tergolong sangat kuat, EC_{50} 50-100 $\mu g/mL$ tergolong kuat, EC_{50} 101-250 $\mu g/mL$ tergolong sedang, dan 250-500 $\mu g/mL$ tergolong lemah, >500 $\mu g/mL$ tergolong sangat lemah, semakin kecil nilai EC_{50} maka aktivitas antioksidan semakin besar (Rosidah & Tjitraesmi, 2017). Dalam penelitian ini fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut mempunyai aktivitas antioksidan yang lebih kecil jika dibandingkan dengan pembanding vitamin C yang mempunyai aktivitas antioksidan sedang dengan nilai EC_{50} sebesar ($134,89 \pm 1,25$) $\mu g/mL$. Berdasarkan nilai EC_{50} dari pembanding vitamin C menunjukkan bahwa untuk mereduksi 0,5 mol Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} , vitamin C hanya membutuhkan konsentrasi sebesar ($134,89 \pm 1,25$) $\mu g/mL$. Hal ini berarti bahwa kemampuan vitamin C dalam mereduksi Fe^{3+} menjadi Fe^{2+} paling besar dibandingkan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform.

Dalam penelitian ini vitamin C digunakan sebagai pembanding karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yang menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Vitamin C mempunyai gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai penangkap radikal bebas dan jika mempunyai gugus polihidroksi akan meningkatkan aktivitas antioksidan (Maryam *et al.*, 2016)

Pada penelitian ini nilai EC_{50} fraksi kloroform lebih kecil daripada fraksi n-heksan, hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan dari fraksi kloroform lebih besar dari pada fraksi n-

heksan. Nilai EC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas antioksidan. Semakin kecil EC_{50} aktivitas antioksidan semakin besar yang artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan aktivitas antioksidan sebesar 50% semakin kecil (Widyaningsih, 2010). Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Qonitah F (2019) yang menyatakan bahwa aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut dengan metode DPPH memiliki nilai IC_{50} sebesar $(714,25 \pm 1,97) \mu\text{g/mL}$ dan $(302,91 \pm 0,28) \mu\text{g/mL}$ yang mana aktivitas antioksidan fraksi kloroform lebih besar daripada fraksi n-heksan. Adanya aktivitas antioksidan tersebut disebabkan kandungan fenolik dan flavonoid pada daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C).

Simpulan dan Saran

Fraksi n-heksan dan fraksi kloroform ekstrak etanol daun jeruk purut memiliki aktivitas antioksidan yang sangat lemah dengan nilai EC_{50} masing-masing sebesar $(9870,36 \pm 1,55) \mu\text{g/mL}$ dan $(9713,30 \pm 0,70) \mu\text{g/mL}$.

Daftar Pustaka

- Abd Ghafar, M. F., Prasad, K. N., Weng, K. K., & Ismail, A. (2010). Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*, *9*(3), 326–330.
- Boligon, A. A. (2014). Technical Evaluation of Antioxidant Activity. *Medicinal Chemistry*, *4*(7), 517–522.
- Fadilah Qonitah, Ahwan, Fridah Wahyu Safitri, R. P. (2020). Penentuan Kandungan Fenolik Total, Flavonoid Total Danaktivitas Antioksidan Daun Jeruk Purut (*Citrus Hystrix*). *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*.
- Irma, L., & Suryanto, E. (2019). Pengaruh Lama Perendaman Terhadap Aktivitas Antioksidan Dari Empulur Sagu Baruk (*Arenga microcharpha*). *Chemistry Progress*, *9*(1).
- Karim, A. A., Azlan, A., Ismail, A., Hashim, P., Abd Gani, S. S., Zainudin, B. H., & Abdullah, N. A. (2014). and Tyrosinase Inhibitory Activities of Cocoa Pod Extract. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *14*(381), 1–13.
- Maryam, S., Baits, M., & Nadia, A. (2016). Pengaruh Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lam.) Menggunakan Metode FRAP. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, *2*(2), 115–118.
- Qonitah, F., & Ahwan, A. (2019). Aktivitas Antioksidan Dan Kandungan Fenolik Total Fraksi N-Heksan Dan Kloroform Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*). *Jurnal Ilmiah As-Syifaa*, *11*(2), 99–102.
- Rosidah, & Tjitraresmi, A. (2017). Potensi Tanaman Melastomataceae Sebagai Antioksidan : Review. *Farmaka*, *16*(1), 24–33.
- Samosir, A. P., Runtuwene, M. R. J., & Citraningtyas, G. (2012). Uji Aktivitas Antioksidan Dan Total Flavonoid Pada Ekstrak Etanol Pinang Yaki (*Areca vestiaria*). *Jurnal MIPA Univ Sam Ratulangi*, *1*(2), 1–6.
- Stojiljković, D., Pavlović, D., & Arsić, I. (2014). Oxidative stress, skin aging and antioxidant therapy. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, *31*(4), 207–217.
- Widyaningsih, W. (2010). Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun dewa (*Gynura procumbens*) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). *Prosiding Seminar Nasional Kosmetika Alami*, 109–115.
- Zuhria, K. H., Danimayostu, A. A., & Iswarin, S. J. (2017). Perbandingan Nilai Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Dan Bentuk Liposomnya. *Majalah Kesehatan FKUB*, *4*(2), 59–68.