

Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan dari Ekstrak Metanol Daun Binjai *Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall Menggunakan Metode DPPH

(Antioxidant Activity Assay from N-Hexane Fraction of Binjai *Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall. Leaves Methanolic Extract Using DPPH Method)

SITI PURNAMA¹, HAFIZ RAMADHAN^{1*}, PUTRI INDAH SAYAKTI²

¹Program Studi S1-Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari, Banjarbaru, Kalimantan Selatan, 70714

²Program Studi D3-Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Borneo Lestari, Banjarbaru, Kalimantan Selatan, 70714

Diterima 12 September 2019, Disetujui 15 Maret 2022

Abstrak: Senyawa antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan dari genus *Mangifera*, salah satunya yaitu *Mangifera caesia* Jack. ex. Wall atau yang lebih dikenal dengan binjai. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa dan aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai terhadap radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Ekstraksi serbuk daun binjai dilakukan menggunakan alat soxlet dengan metanol dan difraksinasi cair-cair menggunakan air dan n-heksan. Skrining fitokimia dilakukan dengan penambahan pereaksi spesifik. Uji aktivitas antioksidan secara kualitatif pada plat KLT yang disemprot dengan DPPH dan pengujian secara kuantitatif dengan mengukur absorbansi peredaman fraksi terhadap radikal DPPH menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa fraksi n-heksan mengandung fenolik, flavonoid dan steroid. Hasil uji kualitatif menunjukkan terdapat senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dengan berubahnya warna bercak noda menjadi kuning dengan latar ungu pada plat KLT setelah disemprot dengan larutan DPPH. Fraksi n-heksan memiliki nilai IC_{50} sebesar 34,0668 ppm dengan IC_{50} kuersetin sebesar 2,4469 ppm. Berdasarkan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai mengandung senyawa golongan fenolik dan flavonoid yang berperan dalam menghasilkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat.

Kata kunci: antioksidan, daun binjai, ekstrak metanol, fraksi n-heksan, DPPH.

Abstract: Natural antioxidant compounds can be found in plants of the *Mangifera* genus, one of them is *Mangifera caesia*, Jack. ex. Wall or which was also known as *binjai*. This study aims to determine group compounds and the antioxidant activity of the n-hexane fraction from the *binjai* leaves methanol extract against 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals. The *binjai* leaves powder extraction was carried out using the soxhlet apparatus with methanol and liquid-liquid fractionation using water and n-hexane. Phytochemical screening was done by adding specific reagents. The antioxidant activity assay qualitatively on TLC that being sprayed with DPPH and quantitative assay by measuring the absorbance of the fraction attenuation against DPPH radicals using a UV-Vis Spectrophotometer. The Phytochemicals screening results showed that the n-hexane fraction contained phenolic, flavonoid, and steroids. The qualitative test results showed some compounds had an antioxidant activity that appeared by changing the color of the spots to yellow on a purple background after spraying with DPPH solution. The n-hexane fraction resulted in an IC_{50} value of 34.0668 ppm with quercetin IC_{50} of 2.4469 ppm. Based on these results, it can be concluded that the n-hexane fraction of *binjai* leaves methanol extract contains phenolic and flavonoid compounds that played a role in producing very strong antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant, *binjai* leaves, methanol extract, n-hexane fraction, DPPH.

*Penulis korespondensi
Email: hafizramadhan14@gmail.com

PENDAHULUAN

ANTIOKSIDAN adalah senyawa yang menghambat laju oksidasi molekul lain atau menetralkan radikal bebas. Kebanyakan stres oksidatif disebabkan oleh radikal bebas yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan sehingga menyebabkannya sangat reaktif. Spesies reaktif yang dihasilkan dalam sel termasuk hidrogen peroksida (H_2O_2), asam hipoklorit ($HClO$), radikal hidroksil ($\cdot OH$), radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$), radikal oksida nitrat ($NO\cdot$), dan radikal lipid peroksil ($LOO\cdot$). Antioksidan bertugas mengurangi spesies oksigen reaktif agar tidak menyebabkan kerusakan pada komponen seluler seperti DNA, protein, karbohidrat, dan lipid. Tubuh tidak mempunyai sistem pertahanan yang berlebih, sehingga jika terjadi paparan radikal berlebih maka dibutuhkan antioksidan eksogen baik dalam bentuk sintetik maupun alami^(1,2).

Senyawa antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan dari genus *Mangifera*, salah satunya yaitu *Mangifera caesia* Jack. ex. Wall atau yang lebih dikenal dengan binjai. Tanaman ini merupakan tanaman endemik Provinsi Kalimantan Selatan. Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa bagian daun dari tanaman tersebut mengandung senyawa fenolik dan flavonoid yang memiliki potensi tinggi sebagai antioksidan^(3,4).

Ramadhan *et al.* menyatakan metode ekstraksi soxlet dengan pelarut metanol lebih efektif dalam menghasilkan aktivitas antioksidan dari daun binjai terhadap radikal DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) dengan nilai IC_{50} sebesar 6,485 ppm dibandingkan ekstrak etanol daun binjai ($IC_{50} = 50,971$ ppm) pada penelitian Norliyanti *et al.*^(5,6) Selain itu, ekstrak metanol daun binjai juga memiliki kemampuan dalam mereduksi logam yang sangat kuat dengan EC_{50} sebesar 5,647 ppm menggunakan metode CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity). Penelitian Ramadhan *et al.* juga telah membuktikan fraksi etil asetat dan air dari ekstrak metanol daun binjai memiliki aktivitas penangkal radikal DPPH yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} secara berturut-turut yaitu 5,356 ppm dan 23,175 ppm⁽⁷⁾.

Flavonoid adalah salah satu golongan polifenolik alami terbesar yang terkandung dalam tanaman dan memainkan peranan penting dalam menghasilkan aktivitas antioksidan dari daun binjai. Aktivitas tersebut dihasilkan karena kandungan flavonoid yang tinggi pada daun binjai, sehingga menghasilkan aktivitas protektif terhadap radikal bebas dan menghambat terjadinya oksidasi^(8,9). Daun binjai memiliki kadar total flavonoid lebih tinggi jika diekstraksi dengan n-heksan (168,129 $\mu gQE/mg$

ekstrak) dibanding menggunakan etanol (77,41 $\mu gQE/mg$) pada ekstraksi secara soxlet⁽¹⁰⁾.

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dipaparkan menunjukkan kandungan flavonoid yang tinggi pada daun binjai memiliki polaritas yang rendah, oleh sebab itu fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai yang belum pernah dilaporkan sebelumnya dapat berpotensi dikembangkan sebagai komponen antioksidan alami, sehingga perlu diketahui potensinya melalui penelusuran lebih lanjut. Latar belakang tersebut mendasari penelitian ini untuk dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui golongan senyawa dan aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai terhadap radikal 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) secara kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan secara kuantitatif untuk mendapatkan nilai IC_{50} .

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Bahan-Bahan yang digunakan antara lain sampel daun binjai, metanol p.a (Merck, Germany), aqua dest (Onemed, Indonesia), metanol teknis (Bratachem, Indonesia), kloroform (Merck, Germany), etil asetat (Bratachem, Indonesia), n-heksana (Bratachem, Indonesia), kuersetin (Sigma aldrich, USA), Pb asetat (Merck, Germany), asetat anhidrida (Merck, Germany), $FeCl_3$ (Merck, Germany), NaOH (Merck, Germany), H_2SO_4 (Merck, Germany), HCl (Merck, Germany), gelatin (Oxoid, Indonesia), NaCl (Merck, Germany), Mg (Merck, Germany), pereaksi Wagner (Merck, Germany), pereaksi Mayer (Merck, Germany), pereaksi Dragendorff (Merck, Germany), plat KLT silika gel GF254 (Merck, Germany), dan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma aldrich, USA). UV-Vis.

Alat. Peralatan yang digunakan dalam penelitian antara lain seperangkat alat soxlet (Pyrex®) beserta alat gelas lainnya, selain itu juga corong pisah (Pyrex®), neraca analitik (Fujitsu®), rotary evaporator (IKFR 10®), penangas air (Mommert®), mikropipet (Dragon Lab®), Vortex (Bionex®), dan pengukuran menggunakan spektrofotometer UV-Vis (PG Instruments-T60®).

METODE. Penyiapan Sampel Daun Binjai. Spesimen binjai dikumpulkan pada bulan November 2019 dari Kelurahan Guntung Manggis, Banjarbaru, Kalimantan Selatan dan dideterminasi oleh Laboratorium Dasar Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lambung Mangkurat, Kalimantan Selatan, sebagai *Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall. Sampel daun binjai yang diambil merupakan daun binjai yang matang (daun keempat dari pucuk sampai daun kelima dari pangkal seperti pada Gambar 1(a))^(11,12).

Pengolahan Simplisia Daun Binjai. Sampel daun binjai (*Mangifera caesia* Jack ex. Wall) dikumpulkan, disortasi basah, dicuci selanjutnya daun dipotong hingga kecil, lalu dikeringkan di dalam ruangan yang bebas dari sinar matahari langsung hingga kering. Setelah didapat simplisia kering, dilakukan penyerbukan, kemudian serbuk diayak hingga halus dengan pengayakan mesh 40. Serbuk simplisia daun binjai hasil pengayakan ditampilkan pada Gambar 1(b)⁽³⁾.

Pembuatan Ekstrak. Ekstraksi daun binjai menggunakan seperangkat alat soxlet dengan pelarut metanol dengan perbandingan antara serbuk dan pelarut adalah 1:5 pada suhu 60°C sampai tetesan siklus tidak berwarna lagi. Ekstrak cair dipekatkan menggunakan rotary evaporator dilanjutkan dengan penangas air pada suhu 50°C hingga diperoleh ekstrak dengan bobot tetap seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1(c)⁽¹⁰⁾.



Gambar 1. (a) Sampel daun yang matang, (b) serbuk simplisia daun, (c) ekstrak metanol daun binjai.

Pembuatan Fraksi N-Heksan. Ekstrak metanol daun binjai ditambahkan aquadest dengan perbandingan 1:2 (50 g : 100 mL), kemudian difraksinasi dengan 100 mL n-heksana. Fraksinasi dilakukan pengulangan sampai diperoleh fase n-heksan jernih. Total fraksi n-heksan dipekatkan menggunakan rotary evaporator dan penangas air hingga diperoleh bobot tetap⁽³⁾.

Skrining Fitokimia. Sampel sebanyak 0,125 g dilarutkan dalam 25 mL pelarut metanol dan diidentifikasi golongan fitokimia.

Uji Flavonoid. Pengujian menunjukkan ekstrak mengandung flavonoid: (1). Sampel 1 mL ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH, jika warna kuning muncul dan memudar ketika ditambahkan HCl; (2). Sampel 1 mL ditambahkan 1 mL Pb asetat 10% dan jika diaduk terjadi perubahan warna larutan menjadi coklat kekuningan; (3). Sampel 1 mL ditambah HCl pekat 1 ml dan serbuk Mg kemudian terbentuk warna kuning, jingga, merah dan hijau^(3,13,14).

Uji Alkaloid. Pengujian alkaloid dilakukan dengan 3 pereaksi, dimana sebelumnya 1 mL sampel ditambahkan HCl 2N sebanyak 2 mL lalu digojok, kemudian masukan 1 mL sampel pada 3 tabung reaksi yang berbeda. Reaksi menunjukkan kandungan alkaloid, jika dengan penambahan pereaksi Dragendroff terbentuk endapan merah, penambahan

pereaksi Mayer terbentuk endapan kuning, dan penambahan pereaksi Wagner terbentuk endapan coklat kemerahan⁽¹⁵⁾.

Uji Fenolik. Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan 1 mL FeCl₃ 5%, jika menghasilkan sedimen merah, ungu, biru, hitam pekat dan warna hijau, menunjukkan kandungan fenol⁽¹³⁾.

Uji Tanin. Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan gelatin 1% yang mengandung NaCl, jika terbentuk sedimen putih, maka menunjukkan kandungan tanin⁽¹⁵⁾.

Uji Saponin. Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan 2 mL aquadest kemudian dikocok kuat selama 1 menit, lalu ditambahkan HCl 1N sebanyak 2 tetes, jika busa yang terbentuk stabil dalam waktu 10 menit, maka menunjukkan kandungan saponin⁽¹⁵⁾.

Uji Steroid-Triterpenoid. Sampel sebanyak 2 mL ditambahkan 0,5 mL kloroform lalu disaring, kemudian 1 mL filtrat ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL H₂SO₄, jika terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan, maka menunjukkan kandungan triterpenoid, sedangkan jika muncul cincin biru kehijauan menunjukkan kandungan steroid⁽¹⁶⁾.

Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan. Sampel dengan konsentrasi 2% ditotolkan pada fase diam silika gel GF254 kemudian dielusi dengan fase gerak yang sudah dioptimasi yaitu n-heksan : etil asetat (1 : 3), setelah elusi dan dikeringkan, lalu disemprot dengan larutan DPPH 0,4 mM⁽¹⁷⁾.

Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum. Larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL dicampurkan dengan 4 mL metanol p.a ke dalam vial gelap (larutan blanko), dihomogenkan dengan vortex dan diukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 500-600 nm^(8,18).

Pengujian Aktivitas Antioksidan Kuersetin. Kuersetin digunakan sebagai standar pembanding yang dibuat seri konsentrasi 1, 2, 3, 4, dan 5 ppm dalam pelarut metanol. Larutan seri tersebut masing-masing sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam vial gelap dan ditambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL kemudian dihomogenkan dengan vortex. Campuran diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit dan absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum^(2,3,18).

Pengujian Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan. Sampel fraksi dibuat seri konsentrasi berbeda yaitu 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dalam pelarut metanol. Larutan seri tersebut masing-masing sebanyak 4 mL dimasukkan ke dalam vial gelap dan ditambahkan larutan DPPH 0,4 mM sebanyak 1 mL kemudian dihomogenkan dengan vortex. Campuran

tersebut diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit dan absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum^(8,18).

Penentuan IC₅₀. Aktivitas peredaman radikal DPPH diekspresikan sebagai nilai IC₅₀ (ppm) yaitu konsentrasi yang dapat meredam radikal DPPH sebesar 50%. IC₅₀ didapatkan dari nilai x dari regresi linier antara konsentrasi vs % inhibisi. Nilai % inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut⁽¹⁸⁾:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Abs. Blanko = Absorbansi DPPH dalam pelarut metanol (tanpa sampel)

Abs.Sampel = Absorbansi sampel uji yang direaksikan dengan DPPH

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi dan Fraksinasi Daun Binjai. Binjai merupakan spesies *Mangifera* yang memiliki potensi aktivitas antioksidan yang sangat tinggi dibandingkan dengan (Mangga) *M. indica*⁽¹⁸⁾. Pada penelitian ini dilakukan evaluasi aktivitas antioksidan dari fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai serta kandungan fitokimia yang berperan dalam menghasilkan sifat antioksidan. Pemilihan metanol sebagai pelarut ekstraksi dikarenakan metanol bersifat polar sehingga dapat melarutkan komponen atau senyawa antioksidan yang mayoritas bersifat polar yaitu golongan fenolik seperti flavonoid dan tanin. Penelitian Adham *et al.* menunjukkan bahwa total flavonoid tertinggi didapatkan pada ekstrak daun binjai yang dimaserasi menggunakan pelarut metanol (0,0522 mgQE/mg ekstrak), diikuti pelarut etanol (0,0382 mgQE/mg ekstrak) dan n-heksan (0,0121 mgQE/mg ekstrak). Hal ini terbukti bahwa total kandungan flavonoid berbanding lurus dengan tingkat polaritas pelarut. Semakin tinggi tingkat polaritas suatu pelarut, semakin tinggi flavonoid dapat diekstraksi⁽⁸⁾.

Fraksi n-heksan didapatkan dari fraksinasi ekstrak metanol daun binjai yang potensi aktivitas antioksidannya belum pernah dilaporkan sebelumnya. Rendemen fraksi n-heksan yang didapat seperti pada Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil rendemen yang diperoleh lebih besar daripada fraksi etil asetat yaitu 3,6% dan lebih rendah dibanding fraksi air (11,68%) dari ekstrak metanol daun binjai⁽⁷⁾. Hasil tersebut masih lebih rendah jika dibandingkan dengan genus *Mangifera* lain, misalnya pada penelitian Dwiatun⁽¹⁹⁾ didapatkan rendemen fraksi n-heksan dari ekstrak

metanol daun Kasturi (*Mangifera casturi* K.) sebesar 10,27%. Pada penelitian Eden *et al.*⁽²⁰⁾, didapatkan hasil % rendemen fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun Mangga (*Mangifera indica*) sebesar 7,16%. Perbedaan hasil yang didapatkan tersebut dikarenakan adanya perbedaan metode ekstraksi yang digunakan dan juga jenis tanaman yang berbeda walaupun termasuk genus yang sama.

Tabel 1. Data rendemen fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai.

Parameter	Hasil
Bahan tumbuhan	Simplisia daun binjai
Bobot ekstrak	10 gram
Bobot fraksi n-heksan	0,446 gram
Rendemen	4,46 %

Metode ekstraksi dengan soklet memiliki prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Metode ini menyebabkan terjadinya perbedaan tekanan antara di dalam sel dan di luar sel sehingga terjadi pemecahan dinding dan membran sel. Hal tersebut terjadi karena pemanasan dapat membantu dalam membuka jaringan tumbuhan agar dapat menarik beberapa zat aktif metabolit sekunder yang tidak dapat keluar hanya dengan suhu kamar seperti pada metode maserasi. Peningkatan suhu akan menyebabkan proses difusi juga lebih besar, sehingga proses ekstraksi juga akan berjalan lebih cepat⁽²¹⁾. Menurut Wijaya *et al.* adapun faktor lain yang dapat mempengaruhi nilai rendemen yang dihasilkan yaitu ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, dan perbandingan jumlah sampel terhadap jumlah pelarut yang digunakan⁽²²⁾.

Skrining Fitokimia. Hasil skrining fitokimia pada fraksi n-heksan menunjukkan kandungan flavonoid, fenol dan steroid (Tabel 2). Hasil tersebut berbeda dengan fraksi air yang teridentifikasi flavonoid, fenol, tannin dan terpenoid, begitupula pada fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun binjai⁽⁷⁾. Berdasarkan hasil tersebut terdapat persamaan hasil skrining fitokimia pada fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai, yaitu mengandung senyawa flavonoid dan fenol. Namun, perbedaan hasil skrining yaitu tidak adanya senyawa tanin dan terpenoid pada fraksi n-heksan, sedangkan pada fraksi air dan etil asetat tidak menunjukkan kandungan steroid. Hal tersebut mungkin dikarenakan berbedanya sifat kepolaran zat aktif sehingga senyawa polar seperti tannin cenderung larut pada pelarut polar, sehingga pada fraksi n-heksan tidak teridentifikasi kandungan tannin dikarenakan n-heksan yang bersifat non polar. Senyawa non polar seperti steroid akan larut pada pelarut non polar juga, sehingga pada fraksi

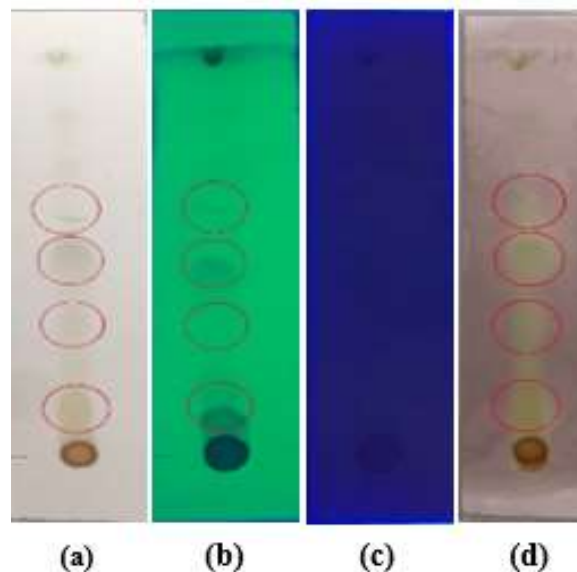
n-heksan menunjukkan hasil positif mengandung steroid, sedangkan pada fraksi air dan etil asetat teridentifikasi negatif⁽²³⁾. Penelitian Dwiatun *et al.* menyebutkan bahwa pada fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun kasturi (*Mangifera casturi* K.) menunjukkan kandungan senyawa triterpenoid saja⁽¹⁹⁾. Sedangkan pada penelitian Eden *et al.* menunjukkan kandungan saponin dan terpenoid pada fraksi n-heksan ekstrak metanol daun mangga (*Mangifera indica* L.)⁽²⁰⁾.

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai.

Metabolit Sekunder	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Fenol	FeCl ₃ 5%	(+)	Terbentuk sedimen hitam
Flavonoid	1. NaOH 10% + HCl 2N	(+)	Terbentuk warna kuning setelah ditambah pereaksi NaOH, memudar setelah penambahan HCl
	2. Pb Asetat 10%	(-)	Tidak terbentuk warna coklat kekuningan
	3. Mg-HCl	(+)	Terbentuk warna kuning kehijauan
Alkaloid	1. HCl + Pereaksi Dragendorf	(-)	Tidak terbentuk endapan merah
	2. HCl + Pereaksi Mayer	(-)	Tidak terbentuk endapan kuning
	3. HCl + Pereaksi Wagner	(-)	Tidak terbentuk endapan coklat kemerahan
Tanin	Larutan gelatin 1% dalam NaCl 2%	(-)	Tidak terbentuk sedimen putih
Saponin	Aquadest + HCl 2N	(-)	Tidak terbentuk buih setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit, dan setelah penambahan HCl 2N.
Steroid-Triterpenoid	Kloroform + Pereaksi Liebermann Burchard	(+)	Terbentuk cincin biru kehijauan menandakan kandungan steroid

Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan. Uji kualitatif aktivitas antioksidan dari fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dielusi dengan fase gerak hasil optimasi yaitu n-heksan : etil asetat (1 : 3), terdapat senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dengan ditandai perubahan warna bercak noda menjadi kuning dengan latar ungu pada plat KLT setelah disemprot dengan larutan DPPH. Hasil uji terlihat 4 bercak noda dengan Rf noda 1 = 0,67; noda 2 = 0,53; noda 3 = 0,33 dan noda 4 = 0,13 seperti pada Gambar 2.

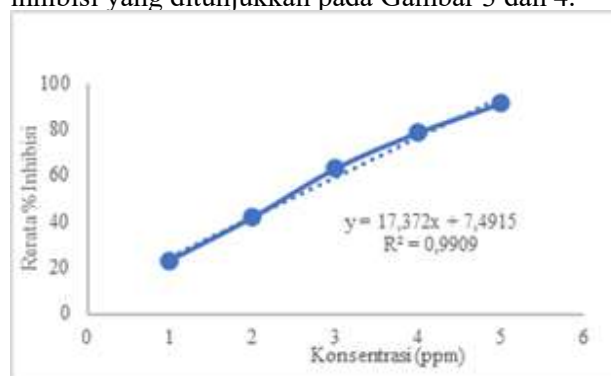
Pada metode ini, larutan DPPH berperan sebagai



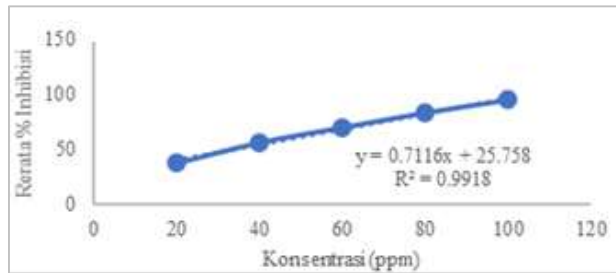
Gambar 2. Pengamatan hasil KLT fraksi n-heksan: (a) secara visual, (b) dibawah sinar UV 254 nm, (c) dibawah sinar UV 366 nm, (d) setelah disemprot DPPH 0,4 mM.

radikal bebas yang akan bereaksi dengan senyawa antioksidan sehingga 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl akan berubah menjadi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin yang bersifat non-radikal. Peningkatan jumlah 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazin akan ditandai dengan berubahnya warna ungu tua yang memudar menjadi warna merah muda atau kuning pucat dan bisa diamati pada plat KLT atau diukur dengan spektrofotometer UV-Vis, sehingga aktivitas peredaman radikal bebas oleh sampel dapat ditentukan⁽²⁴⁾.

Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan. Metode DPPH juga digunakan untuk menyelidiki aktivitas antioksidan secara kuantitatif dari sampel dengan kontrol positif kuersetin. Nilai aktivitas reduksi radikal bebas DPPH dinyatakan dengan IC₅₀, dimana semakin kecil nilai IC₅₀, semakin tinggi aktivitas penangkal radikal bebas dari suatu sampel⁽¹⁸⁾. Hasil uji kuantitatif kuersetin dan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai yang merupakan nilai IC₅₀ didapatkan dari kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi vs % inhibisi yang ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.



Gambar 3. Kurva persamaan regresi linier hubungan konsentrasi vs % inhibisi kuersetin.



Gambar 4. Kurva persamaan regresi linier hubungan konsentrasi vs % inhibisi fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai.

Aktivitas antioksidan kuersetin diperoleh IC_{50} sebesar 2,4469 ppm yang tergolong sangat kuat sebagai antioksidan dibanding nilai IC_{50} dari fraksi n-heksan sebesar 34,0668 ppm (Tabel 3 dan 4). Kuersetin termasuk flavonoid golongan flavonol yang memiliki sifat bioaktif yang sangat potensial terutama sifat antioksidan karena mengandung gugus hidroksil (fenolik) yang dapat menetralkan radikal melalui donor atom hidrogen, sehingga mampu menghasilkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat⁽²⁵⁾. Namun, fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai tergolong kategori aktivitas antioksidan yang sangat kuat karena masih memiliki nilai IC_{50} yang kurang dari 50 ppm⁽²⁶⁾.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan kuersetin.

Konsentrasi (ppm)	Rerata % Inhibisi \pm SD	IC_{50} (μ g/mL)
1	23,02544 \pm 0,4637	
2	41,76707 \pm 1,9306	
3	63,09689 \pm 0,8383	2,4469
4	78,76681 \pm 0,8832	μ g/mL
5	91,38777 \pm 1,0820	

Tabel 4. Hasil uji aktivitas antioksidan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai.

Konsentrasi (ppm)	Rerata % Inhibisi \pm SD	IC_{50} (μ g/mL)
20	37,50543 \pm 2,1907	
40	56,23642 \pm 2,7482	
60	70,01304 \pm 1,8252	34,0668
80	83,48544 \pm 2,1907	μ g/mL
100	95,04563 \pm 0,3449	

Aktivitas antioksidan fraksi n-heksan lebih kecil jika dibandingkan fraksi air dengan IC_{50} 23,175 ppm dan fraksi etil asetat dari ekstrak metanol daun binjai dengan IC_{50} 5,356 ppm. Aktivitas yang dihasilkan berbanding lurus dengan golongan senyawa yang terekstraksi yaitu pada fraksi n-heksan tidak menunjukkan kandungan tannin, sedangkan pada fraksi air dan etil asetat terbukti mengandung tannin yang juga merupakan senyawa fenolik, sehingga mampu menghasilkan aktivitas antioksidan yang lebih

kuat^(7,23). Penelitian Yuliani *et al.* juga menyebutkan kadar total fenolik yang berperan dalam menghasilkan aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksan ekstrak metanol daun binjai yaitu 45,2 μ gGAE/mg fraksi yang tergolong lebih kecil jika dibandingkan fraksi etil asetat (430 μ gGAE/mg fraksi) dan fraksi airnya (782 μ gGAE/mg fraksi)⁽²⁷⁾. Akan tetapi, kadar total flavonoid yang dihasilkan oleh fraksi n-heksan ini (165,06 μ gQE/mg fraksi) lebih tinggi dibandingkan fraksi airnya (118,8 μ gQE/mg fraksi), walaupun masih tergolong lebih rendah jika dibandingkan fraksi etil asetatnya (274,32 μ gQE/mg fraksi)^(7,27). Hasil ini menunjukkan bahwa kandungan senyawa flavonoid dalam ekstrak metanol daun binjai mayoritas memiliki kepolaran yang cukup rendah atau bersifat semi polar sampai non polar⁽¹⁰⁾.

Potensi fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai masih perlu ditelusuri lebih lanjut kandungan senyawanya yang berperan dalam meredam radikal DPPH, karena aktivitas yang dimiliki tergolong dalam kategori antioksidan yang sangat kuat. Selain itu, aktivitas yang dihasilkan masih jauh sangat kuat dibanding fraksi etil asetat buah binjai dengan nilai IC_{50} sebesar 170,63 ppm (kategori antioksidan lemah)⁽²⁸⁾. Hasil yang didapat tersebut jika dibandingkan dengan penelitian Dwiatun⁽¹⁹⁾, yang melakukan uji kuantitatif aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun Kasturi (*Mangifera casturi* K.) mendapatkan hasil IC_{50} sebesar 219,42 ppm yang termasuk kategori sangat lemah sebagai antioksidan. Sedangkan pada penelitian Eden *et al.* yang melakukan uji aktivitas antioksidan pada fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun Mangga (*Mangifera indica* L.) mendapatkan IC_{50} sebesar 106,84 ppm yang termasuk kategori sedang sebagai antioksidan⁽²⁰⁾.

Berdasarkan hasil perbandingan dengan penelitian-penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan yang dihasilkan oleh fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai dikarenakan terdapat kandungan fenol dan flavonoid pada skrining fitokimianya, sehingga memiliki aktivitas yang lebih kuat dalam meredam radikal DPPH dibandingkan dengan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun Kasturi dan fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun Mangga. Senyawa fenolik utama yang terdapat pada binjai salah satunya adalah Mangiferin⁽²⁹⁾. Senyawa tersebut merupakan senyawa fenolik yang memiliki lebih dari satu gugus hidroksil (polifenol)⁽³⁰⁾. Selain itu, kuersetin yang digunakan sebagai kontrol positif pada penelitian ini juga termasuk golongan fenolik berupa senyawa flavonoid yang banyak teridentifikasi dalam beberapa spesies dari genus *Mangifera*⁽³¹⁾.

Kuersetin lebih efektif sebagai antiradikal karena memiliki gugus hidroksi fenolik dalam

struktur molekulnya yang dapat mendonorkan hidrogen radikal⁽³²⁾. Kuersetin memiliki lima gugus hidroksil yang jumlahnya cukup banyak pada setiap molekulnya untuk mereduksi DPPH. Semakin banyak gugus hidroksil bebas yang dapat menyumbangkan hidrogen maka semakin banyak reduksi yang dapat dilakukan terhadap DPPH⁽²⁴⁾. Senyawa fenolik dan polifenol merupakan penangkap radikal yang poten serta memiliki aktivitas peredaman radikal yang memungkinkan mereka untuk menghambat reaksi oksidatif dengan memindahkan salah satu elektronnya (menyumbang hidrogen) pada radikal bebas sehingga menjadi molekul non-radikal yang stabil^(9,33).

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksan dari ekstrak metanol daun binjai (*M. caesia* Jack. ex. Wall.) mengandung senyawa golongan fenolik dan flavonoid yang berperan dalam menghasilkan aktivitas antioksidan secara kualitatif yang dinyatakan dengan terbentuknya bercak berwarna kuning dengan latar belakang ungu pada plat KLT setelah penyemprotan larutan DPPH 0,4 mM dan secara kuantitatif menghasilkan IC₅₀ sebesar 34,0668 ppm dengan kategori sangat kuat.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi (KEMENRISTEK DIKTI) Republik Indonesia atas dukungan dana (Hibah Penelitian Dosen Pemula Tahun Anggaran 2020) dan STIKES Borneo Lestari atas penyediaan fasilitas laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Moussa Z, Judeh ZMA, Ahmed SA. Nonenzymatic Exogenous, and Endogenous Antioxidants. In: Das K, Editor. Free Radical Medicine and Biology. London: IntechOpen; 2019, p. 1-22.
- Ramadhan H, Baidah D, Lestari NP, Yuliana KA. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun, buah dan kulit Terap (*Artocarpus odoratissimus*) menggunakan metode CUPRAC. *Farmasains*. 2020.7(1):7-12.
- Khairiah K, Taufiqurrahman I, Putri DKT. Antioxidant Activity Test Of Ethyl Acetate Fraction Of Binjai (*Mangifera caesia*) Leaf Ethanol Extract. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 2018.51(4):164-68.
- Ismail NA, Abu Bakar MF, Abu Bakar FI, Rahim AC, Murdin N. Underutilized *Mangifera species* (*Mangifera caesia*, *Mangifera quadrifida*, and *Mangifera odorata*) from Borneo: A potential source of antioxidant. *J. Eng. Appl. Sci.* 2019.14(4):1169-77.
- Ramadhan H, Hipmi AF, Sayakti PI. Antioxidant activity of Binjai leaves (*Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall) methanol extract from South Kalimantan using DPPH and CUPRAC methods. *Proceeding Book The 1st ITB International Conference on Pharmaceutical Sciences and Pharmacy*. Bandung, 2020:9-19.
- Norliyanti, Taufiqurrahman I, Sukmana BI. Comparison of Antioxidant Activity between Socletation and Maceration Extraction Method on Binjai Leaf Extract. *Jurnal Kedokteran Gigi*. 2018.3(2):182-88.
- Ramadhan H, Sayakti PI, Ulya R, Hidayati M, Putri ZP, Rauf A, Nafila. Fenol-flavonoid dan aktivitas antioksidan fraksi air dan etil asetat dari daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack. Ex. Wall). *Jurnal Ilmiah Pharmacy*. 2022.9(1):49-58.
- Adham D, Taufiqurrahman I, Helmi ZN. Flavonoid Level Analysis of Binjai Leaf Extract (*Mangifera caesia*) in Ethanol, Methanol, and N-Hexane Solvents. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2019.4(1):46-49.
- Putri AD, Taufiqurrahman I, Dewi N. Antioxidant Activity of Binjai Leaves (*Mangifera caesia*) Ethanol Extracts. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2019.4(1):55-59.
- Rosita JM, Taufiqurrahman I, Edyson. Perbedaan Total Flavonoid Antara Metode Maserasi dengan Sokletasi pada Ekstrak Daun Binjai (*Mangifera caesia*). *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi*. 2017.1(1):100-5.
- Dwidhanti F, Taufiqurrahman I, Sukmana BI. Cytotoxicity Test of Binjai Leaf (*Mangifera caesia*) Ethanol Extract in Relation to Vero Cells. *Dental Journal*. 2018.51(3):108-13.
- Shinde SS & Chavan AR. Isolation of Mangiferin from Different Varieties of *Mangifera indica* Dried Leaves. *International Journal of Scientific & Engineering Research*. 2014.5(6):928-34.
- Ramadhan H, Rezky DP, Susiani EF. Penetapan Kandungan Total Fenolik-Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat Kulit Batang Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterman). *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2021.8(1):58-67.
- Fitriyanti, Norhavid MFR, Ramadhan H. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol 70% Biji Pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat. *Pharmacoscript*. 2020.3(2):144-9.
- Ramadhan H, Arsyad M, Sayakti PI. Skrining Fitokimia Dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Biji Kalangkala (*Litsea angulata* Bl.) Terhadap Bakteri Penyebab Jerawat *Propionibacterium acnes*. *Borneo Journal of Pharmascientech*. 2020.4(1):60-70.
- Ramadhan H, Andina L, Vebruati, Nafila, Yuliana KA, Baidah D, Lestari NP. Perbandingan Rendemen dan Skrining Fitokimia dari Ekstrak Etanol 96% Daun, Buah dan Kulit Buah Terap (*Artocarpus odoratissimus* Blanco). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. 2020.11(2):103-12.
- Sarker SD and Nahar L. Natural Products Isolation.

- In: Walker JM, editor. *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 20,339-42.
18. Mirfat AHS, Salma I, Razali M. Natural antioxidant properties of selected wild *Mangifera* species in Malaysia. *J. Trop. Agric. Food Sci.* 2016.44(1):63-72.
 19. Dwiatun, I. Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, Dan Fraksi Air Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm.) Terhadap DPPH. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. 2018.
 20. Eden WT, Buanasari, Setyowati. Aktivitas Antioksidan Fraksi dan Ekstrak Metanol Daun Mangga (*Mangifera indica* L.) dengan Metode Serapan DPPH Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. *Prosiding SNKPK.* 2016:305-15.
 21. Pamungkas DK, Retnaningtyas Y, Wulandari L. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Gadung (*Mangifera indica* L. var. gadung) dan Ekstrak Etanol Daun Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.). *e-Jurnal Pustaka Kesehatan.* 2017. 5(1):47-9.
 22. Wijaya H, Novitasari, Jubaidah S. Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (*Sonneratia caseolaris* L. Engl). *Jurnal Ilmiah Manuntung.* 2018.4(1):79-83.
 23. Saidi N, Ginting B, Murniana, Mustanir. Analisis Metabolit Sekunder. Banda Aceh: Syiah Kuala University Press; 2018. p. 12-29.
 24. Sayuti K and Yenrina R. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press; 2015.
 25. Kumar S and Pandey AK. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal.* 2013:1-16.
 26. Putri AAS and Hidayati N. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry.* 2015.4(1):1-6.
 27. Yuliani CR, Ramadhan H, Sayakti PI, Torizellia C. Total Phenolic and Flavonoid Contents of n-Hexane Fraction in Binjai Leaves (*Mangifera caesia* Jack. ex. Wall). *Jurnal Ilmiah Farmasi.* 2022. Special Edition:11-2.
 28. Paulinus YVG, Jayuska A, Ardiningsih P, Nofiani R. Aktivitas Antioksidan dan Kandungan Total Fenol Fraksi Etil Asetat Buah Palasu (*Mangifera caesia* Jack). *Jurnal Kimia Khatulistiwa.* 2015.4(1):47-50.
 29. Sulaiman SF and Ooi KL. Polyphenolic and Vitamin C Contents and Antioxidant Activities of Aqueous Extracts from Mature-Green and Ripe Fruit Fleshes of *Mangifera* sp. *J Agric Food Chem.* 2012. 60(47):11832-8.
 30. Anwar K, Fadillaturahmah, Sari DP. Analisis Kandungan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Binjai (*Mangifera caesia* Jack.). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina.* 2017.2(1):20-30.
 31. Ahmad S, Sukari MA, Ismail N, Ismail IS, Abdul AB, Abu Bakar MF, et al. Phytochemicals from *Mangifera pajang* Kosterm and Their Biological Activities. *BMC Complement Altern Med.* 2015. 15(1):1-8.
 32. Murwanto PE and Santosa D. Uji Aktivitas Antioksidan Tumbuhan *Cynara scolimus* L., *Artemisia china* L., *Borreria repens* DC., *Polygala paniculata* L. Hasil Koleksi dari Taman Nasional Gunung Merapi Dengan Metode Penangkapan Radikal DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). *Majalah Obat Tradisional.* 2012.17(3):53-60.
 33. Karim K, Jura MR, Sabang SM. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* L.). *Jurnal Akademika Kimia.* 2015. 4(2):57-63.