

AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI FLAVONOID BEBAS ANDROGRAFOLID DARI HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata*)

Eka Prasasti Nur Rachmani^{1,2*}, Suwijyo Pramono¹, Agung Endro Nugroho¹

¹Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

²Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu-ilmu Kesehatan, Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Jawa Tengah

Corresponding author: ekasholehah@yahoo.com

081391280002

ABSTRACT

*This study aims to determine the antioxidant activity of andrographolide-free flavonoid fraction (FFBA) from bitter herbs (*Andrographis paniculata*). FFBA is a fraction that contains flavonoids and the andrographolide compounds has been removed. The antioxidant activity of FFBA was tested using the method of reducing free radicals from DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) and using quercetin as a standard. The results showed that FFBA has antioxidant activity with strong activity with IC_{50} value of 88.98 $\mu\text{g} / \text{mL}$ while quercetin has a very strong activity with IC_{50} value of 3.42 $\mu\text{g} / \text{mL}$.*

Key Words : antioxidant, *Andrographis paniculata*, DPPH, flavonoid

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada fraksi flavonoid bebas andrografolid (FFBA) dari herba sambiloto (*Andrographis paniculata*). FFBA merupakan fraksi yang mengandung flavonoid dan sudah dihilangkan kandungan senyawa andrografolid. Aktivitas antioksidan FFBA diuji dengan menggunakan metode peredaman radikal bebas dari DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil) dengan baku pembandingan kuersetin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa FFBA memiliki aktivitas antioksidan dengan aktivitas yang kuat yaitu dengan nilai IC_{50} sebesar 88.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sedangkan kuersetin memiliki aktivitas yang sangat kuat yaitu dengan nilai sebesar 3,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Kata kunci : antioksidan, *Andrographis paniculata*, DPPH, flavonoid

PENDAHULUAN

Sambiloto (*Andrographis paniculata*) secara turun-temurun telah dimanfaatkan untuk berbagai macam pengobatan. Sambiloto dipercaya dapat mengobati diabetes (Wahyuningrum dkk., 2016), tekanan darah tinggi, rematik, gatal-gatal, keputihan dan diuretik.

Herba sambiloto mengandung lebih dari 55 diterpenoid, 30 flavonoid, 8 asam quinat dan 4 xanton (Hossain, dkk., 2014). Jenis flavonoid yang terkandung adalah apigenin, kuersetin, 7-O-metilwogonin, luteolin, golongan flavon yang termetoksilasi serta golongan xanton yang termetoksilasi (Hossain dkk., 2014).

Flavonoid adalah salah satu senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Salah satu mekanismenya adalah flavonoid dapat mereduksi radikal bebas. Flavonoid seperti kalkon, flavon, flavonol, flavanone, dan katekin memiliki aktivitas antioksidan (Edy dkk., 2017; Markham, 1988).

Sebagian besar penyakit diawali oleh reaksi oksidasi yang berlebihan didalam tubuh. Radikal bebas merupakan molekul yang mempunyai satu atau lebih elektron tidak berpasangan dalam orbital luarnya sehingga sangat reaktif mencari pasangannya. Kejadian seperti ini menimbulkan reaksi berantai dan sel-sel tubuh mengalami kerusakan. Oleh karena itu dibutuhkan antioksidan untuk menghambat atau mencegah proses reaksi radikal bebas.

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak air herba sambiloto memiliki kandungan flavonoid total sebesar 3,7%. Fraksinasi dari ekstrak air diperoleh bahwa kandungan flavonoid

tertinggi terdapat pada fraksi etil asetat yaitu sebesar 9,26% (Rachmani^a dkk, 2016). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat memiliki kandungan flavonoid yang cukup tinggi. Fraksi etil asetat herba sambiloto dari ekstrak air juga memiliki aktivitas antioksidan yang cukup tinggi yaitu dinyatakan dengan nilai IC₅₀ sebesar 402,5 µg/mL (Rachmani^b dkk, 2016).

Ekstrak etil asetat herba sambiloto memiliki kandungan andrografolid dan flavonoid (Rachmani^b dkk, 2016). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan melalui metode peredaman radikal bebas dari fraksi flavonoid yang tidak mengandung andrografolid. Fraksi ini selanjutnya disebut sebagai fraksi flavonoid bebas andrografolid (FFBA).

METODE PENELITIAN

Bahan Penelitian

Bahan penelitian adalah herba sambiloto (*Andrographis paniculata*) yang diambil dari daerah Kulon Progo, Yogyakarta pada bulan Maret 2016. Difenilpikril Hidrazil Hidrat (DPPH) dari Sigma. Pelarut yang digunakan adalah aquades, kloroform, etil asetat, metanol, dan silika gel 60 F₂₅₄ from coloum dari E'Merck.

Prosedur Penelitian

Penyiapan Bahan (Edy dkk., 2016)

Tanaman sambiloto yang dipanen pada umur 3-4 bulan. Herba sambiloto yang digunakan adalah daun dan batang. Herba yang sudah dikumpulkan kemudian disortasi dan dibersihkan dengan dengan air mengalir. Pengeringan herba sambiloto dilakukan dalam oven suhu 50-60°C. Herba sambiloto yang kering(ditandai

dengan remuk ketika diremas) kemudian dibuat serbuk untuk memperbesar luas permukaan.

Pembuatan fraksi flavonoid bebas andrografolid (FFBA)

Sebanyak 300 mg serbuk simplisia sambiloto ditimbang kemudian dilakukan perebusang dengan metode dekokta, yaitu dengan mendidihkan serbuk simplisia selama 30 menit. Waktu dihitung setelah suhu mencapai 90°C. Filtrat hasil dekokta kemudian dikentalkan menggunakan cawan porselen di atas penangas air.

Filtrat kental herba sambiloto kemudian dipartisi berturut-turut dengan menggunakan kloroform dan etil asetat. Filtrat kental herba sambiloto ditambah kloroform kemudian dilakukan penggojogan. Setelah terbentuk dua lapisan, lapisan kloroform (bagian bawah) dipisahkan. Partisi dengan kloroform diulang tiga kali. Filtrat kloroform yang diperoleh kemudian dijadikan satu dan diuapkan hingga diperoleh fraksi kloroform. Partisi dilanjutkan dengan menambahkan pelarut etil asetat pada residu. Partisi dilakukan dengan cara yang sama seperti partisi dengan menggunakan kloroform, maka akan diperoleh fraksi etil asetat. Fraksi etil asetat yang diperoleh kemudian dihilangkan kandungan andrografolidnya dengan cara dilakukan kromatografi kolom vakum (KVC). Penentuan fraksi yang tidak mengandung andrografolid dilakukan berdasarkan kromatografi lapis tipis (KLT). Fraksi yang sudah tidak mengandung andrografolid ini selanjutnya disebut dengan fraksi flavonoid bebas andrografolid (FFBA).

Penetapan Aktivitas Antioksidan

7,88 mg DPPH serbuk ditambahkan ke volume 200 mL metanol

untuk mendapatkan larutan DPPH 0,1 mM. Larutan DPPH harus dibuat baru. 2 mL larutan DPPH ditambahkan dengan 1 mL etanol. Campuran DPPH dan larutan FFBA dibiarkan ditempat gelap selama 30 menit. Larutan diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm dengan blanko metanol.

Penetapan *operating time* dilakukan berdasarkan waktu yang dibutuhkan antara ekstrak dan DPPH bereaksi secara optimal. Larutan DPPH dimasukkan ke dalam 8 tabung reaksi, masing-masing 2 mL. Kemudian ditambahkan 1 mL FFBA dengan konsentrasi 100 µg/mL. Setiap tabung reaksi diinkubasi di tempat gelap dengan waktu yang berbeda dalam baku 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit, 25 menit, 30 menit, 35 menit, dan 40 menit. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 515,5 nm dengan blanko metanol.

FFBA herba sambiloto dibuat dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 15, 30, 60 dan 120 ppm. Setiap konsentrasi sampel diambil 1 mL, dan ditambahkan 2 mL larutan DPPH. Sampel yang homogen dan kemudian didiamkan selama 30 menit di tempat gelap. Pengukuran peredaman radikal bebas dilakukan pada panjang gelombang 515,5 nm.

Senyawa yang digunakan sebagai pembanding adalah kuersetin yang sudah diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Kuersetin juga merupakan senyawa yang terkandung dalam herba sambiloto. Pengukuran peredaman radikal bebas kuersetin dilakukan dengan cara yang sama seperti FFBA.

Analisis Data

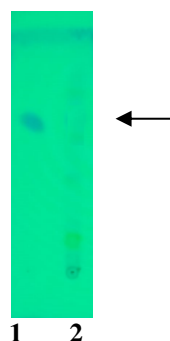
Persen peredaman diperoleh dari rata-rata nilai absorbansi sampel. % peredaman radikal bebas dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Peredaman} = \left(1 - \frac{\text{Absorbansi sampel uji}}{\text{Absorbansi pembanding}} \right) \times 100 \%$$

Kurva hubungan konsentrasi sampel vs persen penghambatan akan menghasilkan persamaan regresi sehingga dapat dihitung nilai IC₅₀.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan fraksi flavonoid bebas andrografolid (FFBA) dari ekstrak air herba sambiloto dilakukan dengan metode kromatografi kolom vakum. FFBA yang diperoleh kemudian dideteksi bahwa sudah tidak mengandung andrografolid dengan metode KLT seperti pada gambar 1.

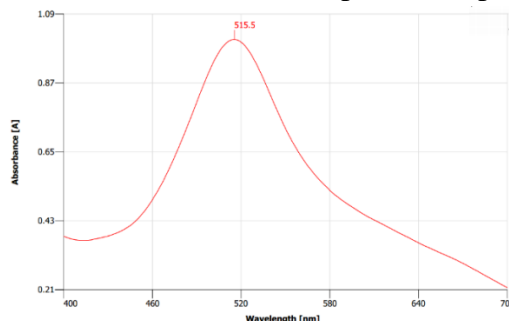


Gambar 1. Isolat andrografolid (1) dan FFBA (2). Fase diam silika dan fase gerak heksan : etil asetat (1:4). Dilihat pada UV₂₅₄. (← : Rf isolat andrografolid yaitu 0,65).

Dari gambar 1 menunjukkan bahwa eluasi andrografolid dengan fase gerak diatas diperoleh bercak andrografolid pada Rf 0,65. Pada FFBA sudah tidak mengandung andrografolid. Hal ini dibuktikan bahwa pada FFBA tidak terdapat bercak andrografolid pada Rf yang sama,

Aktivitas peredaman radikal bebas diukur dengan menggunakan metode

pengukuran DPPH. Metode DPPH dipilih karena mudah, cepat, peka dan memerlukan sedikit sampel. Sebelum melakukan pengukuran absorbansi sampel, dilakukan terlebih dahulu pengukuran panjang gelombang maksimal DPPH. Panjang gelombang maksimum DPPH diperoleh pada 515,5 nm. Hasil pengukuran panjang gelombang maksimal dapat dilihat pada gambar 2.



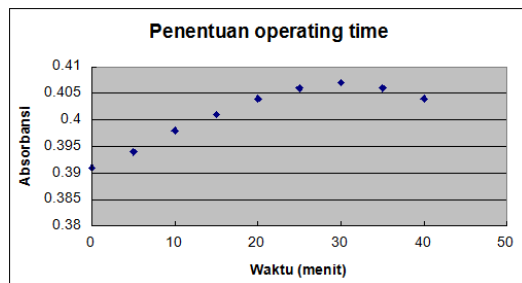
Gambar 2. Panjang gelombang maksimum DPPH dalam metanol

Pengukuran absorbansi aktivitas kuersetin sebagai pembanding dan sampel

FFBA dalam larutan DPPH dilakukan pada panjang gelombang 515,5 nm.

Penentuan *operating time* (OT) dilakukan untuk mengetahui waktu pengukuran paling stabil saat sampel

bereaksi sempurna dengan DPPH. Penentuan OT dapat dilihat pada gambar 3



Gambar 3. Penentuan operating time

Hasil scanning OT diperoleh waktu optimal pengukuran terjadi pada menit ke-30 sehingga pengukuran absorbansi sampel dilakukan pada menit ke-30.

Pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan blanko larutan DPPH

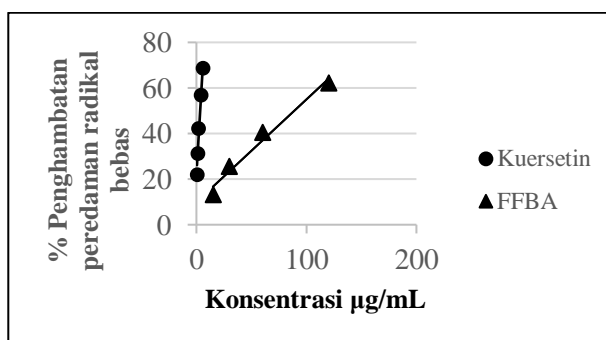
radikal dalam metanol. Pengukuran dilakukan pada FFBA pada beberapa konsentrasi yang berbeda. Pengukuran dilakukan tiga kali pada tiap-tiap sampel pada menit ke-30. Hasil rata-rata pengukuran peredaman radikal bebas dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas peredaman radikal bebas

| Senyawa | Konsentrasi (µg/mL) | Rata-rata % penghambatan |
|------------------|---------------------|--------------------------|
| Kuersetin | 0,5 | 21,756 |
| | 1 | 31,238 |
| | 2 | 42,116 |
| | 4 | 56,886 |
| | 6 | 68,663 |
| | FFBA | 62,5 |
| | 125 | 25,399 |
| | 250 | 40,369 |
| | 500 | 62,226 |

Aktivitas peredaman radikal bebas dari kuersetin dan FFBA pada tabel 1 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi, semakin besar persen

penghambatan. Grafik persen penghambatan dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar4. Aktivitas peredaman radikal bebas

Grafik 4 menunjukkan hubungan antara konsentrasi dengan persen peredaman radikal bebas dari kuersetin dan FFBA dari herba sambiloto. Semakin tinggi konsentrasi, %peredaman radikal bebas juga semakin tinggi. Konsentrasi yang kecil pada kuersetin dapat meredam radikal bebas dengan aktivitas yang tinggi. Pada FFBA membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi untuk dapat meredam radikal bebas.

Aktivitas antioksidan (melalui mekanisme peredaman radikal bebas) dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$) yang mampu menghambat proses oksidasi sebesar 50%. Dari persamaan regresi diatas diperoleh nilai IC_{50} seperti terdapat pada tabel 2 berikut ini.

Tabel 2. Nilai persamaan regresi linear dan aktivitas antioksidan dari FFBA herba sambiloto

| No | Sampel uji | Persamaan regresi | Aktivitas Antioksidan IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) |
|----|---|------------------------|--|
| 1 | Kuersetin | $y = 8.1774x + 22.053$ | 3.42 |
| 2 | FFBA (fraksi flavonoid bebas andrografolid) | $y = 0.4505x + 9.9128$ | 88.98 |

Aktivitas antioksidan ditetapkan dengan nilai IC_{50} . Kuersetin memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar $3,42 \mu\text{g/mL}$ sedangkan FFBA memiliki nilai IC_{50} sebesar $88,98 \mu\text{g/mL}$. Semakin rendah nilai IC_{50} mengindikasikan bahwa semakin kuat aktivitas suatu senyawa uji dalam meredam adanya radikal bebas sehingga semakin tinggi aktivitas antioksidan.

Kategori penentuan kekuatan aktivitas antioksidan menurut Mardawati pada tahun 2008 menyatakan bahwa jika $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktivitas antioksidan yang sangat kuat, pada $50-100 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktivitas kuat, pada $101-150 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktivitas sedang, dan jika $151-200 \mu\text{g/mL}$ menunjukkan aktivitas lemah.

Pengujian antioksidan pada FFBA dengan pembanding kuersetin menunjukkan bahwa kategori aktivitas antioksidan FFBA termasuk kuat yaitu

sebesar $88,98 \mu\text{g/mL}$ sedangkan kategori aktivitas antioksidan kuersetin termasuk sangat kuat sebesar $3,42 \mu\text{g/mL}$. FFBA merupakan fraksi yang mengandung flavonoid yang dominan. Hal ini menunjukkan bahwa flavonoid dari herba sambiloto memiliki aktivitas antioksidan melalui peredaman radikal bebas.

DPPH larut dalam pelarut polar misalnya metanol dan etanol. DPPH adalah radikal yang stabil dan dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang $515,5 \text{ nm}$. Pencampuran radikal DPPH dengan senyawa yang dapat menyumbangkan atom hidrogen. Hal ini akan memunculkan bentuk tereduksi yang ditunjukkan dengan perubahan warna ungu menjadi kuning. Perubahan warna ini dapat diukur secara spektrofotometri.

Penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak etanol sambiloto menunjukkan nilai IC_{50} sebesar $792,126 \mu\text{g/mL}$ dengan baku standar kuersetin

yang memiliki nilai IC_{50} sebesar 3,403 $\mu\text{g/mL}$ (Rais, 2015). Penelitian yang dilakukan Saranya dkk yaitu menguji aktivitas antioksidan dari isolat andrografolid dari ekstrak sambiloto dan standar asam askorbat. Nilai IC_{50} dari andrografolid 6 $\mu\text{g/mL}$, tidak jauh berbeda dengan IC_{50} standar asam askorbat yaitu 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (Saranya dkk, 2010). Didalam ekstrak dan fraksi dari herba sambiloto terdapat kandungan flavonoid dan andrografolid. Aktivitas antioksidan dari herba sambiloto karena adanya kandungan flavonoid dan andrografolid.

Flavonoid memiliki aktivitas sebagai antioksidan karena sifatnya sebagai akseptor yang baik terhadap radikal bebas, yaitu suatu spesies yang memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan dalam orbitalnya seperti hidroksi radikal dan superoksida yang biasa disebut sebagai ROS (*Reactive Oxygen Species*) (Sathiskumar *et al.*, 2008).

Aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dikarenakan adanya penangkapan radikal bebas melalui donor proton hidrogen dari gugus hidroksil dari flavonoid. Aktivitas antioksidan pada flavonoid dipengaruhi substitusi gugus hidroksi pada posisi orto dan para terhadap gugus OH dan OR.

Adanya kandungan flavonoid pada herba sambiloto, menyebabkan herba sambiloto memiliki aktivitas antioksidan. Herba sambiloto memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai antioksidan.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh maka dapat diambil kesimpulan bahwa fraksi flavonoid bebas

andrografolid dari herba sambiloto memiliki aktivitas antioksidan dengan katagori kuat yaitu dengan nilai IC_{50} sebesar 3,42 $\mu\text{g/mL}$.

DAFTAR PUSTAKA

- Edy, H.J., Marchaban, Wahyuono, S., dan Nugroho, A.E., 2016. Formulasi Dan Uji Sterilitas Hidrogel Herbal Ekstrak Etanol Daun *Tagetes erecta* L. *Pharmakon*, **5**: 9–16.
- Edy, H.J., Marchaban, Wahyuono, S., dan Nugroho, A.E., 2017. Formulation and Evaluation of Hydrogel Containing *Tagetes erecta* L. Leaves Etanolic Extract. *International Journal of Current Innovation Research*, **3**: 627–630.
- Eka Prasasti Nur Rachmani^a, Suwijijyo Pramono, and Agung Endro Nugroho. 2016. Total flavonoid content of extract and fractions from *andropholis paniculata* herbs and its thin layer chromatographic profile. *Proceeding Book International Conference Cardiovascular Diseases Cvd-Ia: Integrated Approach from Basic, Clinical Science, Public Health and Bioethics Science*. Yogyakarta, May 14-17, 2016. ISBN : 978-979-3232-24. Hal 145-152.
- Eka Prasasti Nur Rachmani^b dan Tuti Sri Suhesti. 2016. Aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi herba sambiloto (*Andropholis*

- paniculata*). *Media Pharmaceutica Indonesiana*. Vol. 1 No. 2. Hal 100-105.
- Hossain, M.S., Urbi, Z., Sule, A., dan Rahman, K.M.H., 2014. *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall. ex Nees: A Review of Ethnobotany, Phytochemistry, and Pharmacology. *The Scientific World Journal*, **2014**: 1–28.
- Mardawati, E., F. Filianty dan H. Harta. 2008. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.) dalam Rangka Pemanfaatan Limbah Kulit Manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. Hal. 4.
- Molyneux, P., 2004, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakar J. Sci. Technol., 26 (2) : 211-219.
- Rais, I.R, 2016, aktivitas antioksidan ekstrak *andrographis paniculata*, (burm.f.) Ness dengan dua perbedaan penguapan, *pharmaciana*, vol. 6, no.1, 2016:95-100.
- Saranya *et al.*2010,the antioxidant and h^+k^+ atpase inhibitory effect of *andrographis paniculata* and andrographolide *in vitro* and *in vivo* studies, *pharmacologyonline* 1: 356-376.
- T. Sathish kumar *, m. Sampath, s. V. Sivachandran, s. Shanmugam and p. Rajasekaran. 2009. Optimal process for the extraction and identification of flavonoids from the leaves of *Polyalthia longifolia* using L16 Orthogonal design of experiment. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3(4): 736-745.
- Wahyuningrum, R., Wahyono, D., Mustofa, M., dan Prabandari, Y.S., 2017. A Qualitative Study Discovering the Common Medication-Therapy Problems in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) in Indonesia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, **10**: 246.