

# UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOLIK HERBA ALFALFA (*Medicago sativa* L.) DENGAN METODE DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil)

Herni Widyowati<sup>1)</sup>, Maria Ulfah<sup>1)</sup>, Sumantri<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim Semarang

<sup>2)</sup> Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta

---

## INTISARI

Tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) diketahui mengandung senyawa flavonoid dan vitamin C yang dapat berperan sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak etanolik herba alfalfa dengan metode DPPH dan untuk mengetahui kandungan senyawa aktifnya.

Penelitian ini dilakukan dengan membuat ekstrak etanolik herba alfalfa dengan metode maserasi menggunakan pelarut penyari etanol 70%. Ekstrak dibagi menjadi konsentrasi (10, 20, 40 dan 80 µg/mL). Sebagai pembanding digunakan vitamin C dengan konsentrasi (1, 2, 4 dan 8 µg/mL). Sebagai blanko digunakan DPPH 0,1 mM. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan mereaksikan 50 µL ekstrak etanolik herba alfalfa dengan 4,0 mL DPPH 0,1 mM, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometri visibel dengan panjang gelombang 525 nm. Data yang diperoleh dihitung untuk mengetahui aktivitas antioksidannya. Nilai IC<sub>50</sub> diperoleh dari analisa probit, sedangkan analisa secara statistik menggunakan uji T dan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif dalam ekstrak etanolik herba alfalfa dilakukan uji KLT.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik herba alfalfa mempunyai aktivitas antioksidan, dengan nilai IC<sub>50</sub> ekstrak etanolik herba alfalfa sebesar 59,339 µg/mL, nilai IC<sub>50</sub> dari larutan standar vitamin C sebesar 4,768 µg/mL. Hasil uji KLT memberikan warna kuning yang menunjukkan bahwa ekstrak etanolik herba alfalfa mengandung flavonoid. Hasil uji statistik untuk aktivitas antioksidan menunjukkan perbedaan yang tidak signifikan antara ekstrak etanolik herba alfalfa dengan vitamin C. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanolik herba alfalfa yang mengandung flavonoid memiliki aktivitas antioksidan.

**Kata kunci:** ekstrak etanolik herba alfalfa (*Medicago sativa* L.), IC<sub>50</sub>, Antioksidan

## ABSTRACT

Alfalfa (*Medicago Sativa* L.) plant is known to have compounds of flavonoid and vitamine C which can serve as antioxidants. This research aims knowing the antioxidant activity of alfalfa herbal ethanolic extract using DPPH (1,1-diphenyl-2-pikrilhydrazil method and knowing the content of its active compound have wan.

The research was performed by making alfalfa herbal ethanolic extract by maceration method using ethanol extracting solvent 70%. The extract was divided into some concentrations of 10, 20, 40 and 80 µg/ml. As a comparison, vitamine C was used with concentrations of 1, 2, 4, and 8 µg/ml. The test of antioxidant activity was conducted by reacting 50 µl of alfalfa herbal ethanolic extract with 4.0 ml DPPH 0.1 mM, then it was measured for the absorbance using visible spectrophotometry with a wavelength of 525 nm. The obtained data was calculated to discover its antioxidant activity. The statistical analysis used was Mann-Whitney test. The IC<sub>50</sub> value was gained using probit analysis and the statistical analysis used t-test and to discover the content of active compound in alfalfa herbal ethanolic extract, TLC test was performed.

The research result indicated that the alfalfa herbal ethanolic extract had antioxidant activities with alfalfa herbal ethanolic extract IC<sub>50</sub> value of 59.339 µg/ml, and standard solution of vitamine C IC<sub>50</sub> value of 4.768 µg/ml. The result of statistical test for IC<sub>50</sub> indicated an insignificant difference between alfalfa herbal ethanolic extract and vitamine C. Otherside it could

be concluded that the alfalfa herbal ethanolic extract containing flavonoid had antioxidant activities.

**Keywords:** Alfalfa (*Medicago sativa* L.) herbal ethanolic extract, IC<sub>50</sub>, antioxidant

## PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu molekul atau atom yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan. Elektron tersebut sangat reaktif dan cepat bereaksi dengan molekul lain sehingga terbentuk radikal bebas baru dalam jumlah besar secara terus menerus. Radikal bebas dapat menimbulkan kerusakan di berbagai bagian sel dan menyebabkan berbagai penyakit seperti tumor, kanker, aterosklerosis, katarak, keriput, penuaan dan lainnya (Anonim, 2007).

Salah satu senyawa kimia yang mampu menghambat penuaan dan mengatasi berbagai macam penyakit kronis yang diakibatkan oleh radikal bebas, dapat mencegah proses oksidasi atau menghambat radikal bebas adalah antioksidan (Halliwell and Gutteridge, 2000). Mekanisme kerja antioksidan secara umum adalah menghambat oksidasi lemak yang terdiri dari tiga tahap utama yaitu inisiasi, propagasi, dan terminasi (Kumalaningsih, 2006). Ada dua jenis antioksidan yaitu antioksidan endogen dan antioksidan eksogen. Berdasarkan fungsinya antioksidan dibedakan menjadi 5 (lima) yaitu antioksidan primer, antioksidan sekunder, antioksidan tersier, *oxygen scavenger*, dan *chelators*.

Penentuan aktivitas antioksidan salah satunya dapat dilakukan dengan menggunakan metode DPPH. Metode ini sering digunakan karena bersifat sederhana, mudah, cepat, dan peka serta hanya memerlukan beberapa sampel. Senyawa antioksidan akan bereaksi dengan radikal DPPH melalui mekanisme donasi atom hidrogen dan menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning (Hanani *et al.*, 2005). *Inhibition Concentration*<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>) didefinisikan sebagai konsentrasi efektif zat dalam sampel yang dapat menghambat 50% absorpsi DPPH. Harga IC<sub>50</sub> berbanding terbalik dengan kemampuan zat/senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Semakin kecil nilai IC<sub>50</sub> berarti semakin kuat daya antioksidannya.

Alfalfa merupakan tanaman dari famili fabaceae secara empiris dapat

digunakan, antara lain untuk antikoosterol, antifungi, antispasmodik, antitrombotik, diuretik, antihiperlipidemia, antiinflamasi, dan antikanker (Newall *et al.*, 1996). Alfalfa juga kaya akan serat yang dapat mengikat lemak dan zat karsinogen penyebab kanker (Anonim, 2007). Penelitian terhadap tanaman alfalfa sebelumnya sudah pernah dilakukan diantaranya adalah uji antihiperlipidemia ekstrak etanolik batang dan daun alfalfa pada tikus jantan yang dibebani glukosa dan identifikasi kandungan senyawa aktifnya (Laksmonowati, 2006), dan uji antiinflamasi ekstrak etanolik herba alfalfa pada tikus jantan yang diinduksi karagenin, beserta identifikasi kandungan senyawa aktifnya (Yuniarti, 2007). Berdasarkan uraian di atas, belum pernah dilakukan penelitian tentang aktivitas antioksidan pada tanaman alfalfa maka perlu dilakukan penelitian mengenai manfaat tanaman alfalfa sebagai antioksidan berdasarkan nilai *Inhibition Concentration*<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>).

## METODOLOGI

### Alat

Alat penelitian yang digunakan: seperangkat alat gelas (Iwaki pyrex), timbangan elektrik (Ohaus), mikropipet, stirer, spektrofotometer UV-Vis (Genesys) 10 UV, lempeng KLT, *chamber*, tutup *chamber*, pipa kapiler, kertas penjunah, alat penampak bercak, lampu UV254 nm, dan lampu UV365 nm, evaporator.

### Bahan

Bahan penelitian yang digunakan: akar, batang dan daun tanaman alfalfa, etanol 70%, silika gel 60 F<sub>254</sub> p.a. (E.Merck), selulose p.a. (E.Merck), kloroform, metanol, etil asetat, asam formiat, asam asetat, asam fosfomolibdat p.a. (E.Merck), ammonia p.a. (E.Merck), vitamin C p.a. (E.Merck), rutin p.a. (E.Merck), DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil) p.a. (Sigma), etanol p.a.

## **Jalannya Penelitian**

### **Identifikasi tanaman**

Determinasi tanaman alfalfa (*Medicago sativa* L.) dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Negeri Semarang.

### **Pengumpulan bahan**

Bahan yang digunakan adalah akar, batang dan daun alfalfa (*Medicago sativa* L.) yang diperoleh dari desa Pandean Kidul, Magelang. Bahan diambil secara acak pada musim penghujan dan usianya 2 bulan.

### **Pembuatan serbuk simplisia**

Bahan yang telah diperoleh dari pengumpulan, dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang menempel, tiriskan, kemudian diangin-anginkan di tempat yang teduh atau tidak terkena sinar matahari langsung dan ditutup dengan kain hitam sampai kering. Tujuannya adalah simplisia tidak mudah rusak dan tidak terjadi kerusakan dekomposisi kandungan senyawa dalam tanaman alfalfa.

### **Pembuatan ekstrak etanolik herba alfalfa (*Medicago sativa* L.)**

Pembuatan ekstrak dengan metode maserasi adalah sebagai berikut kurang lebih 100,0 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam toples, kemudian dituangi 750 ml etanol 70%, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya, sambil berulang-ulang diaduk. Setelah 5 hari diserkai dengan bukner dan ampas ditambah cairan penyari secukupnya, diaduk dan siserkai kembali sehingga diperoleh seluruh sari sebanyak 1000 ml. Kemudian sari ditutup dan dibiarkan di tempat sejuk, terlindung cahaya selama 2 hari, kemudian endapan dipisahkan (Depkes RI, 1986). Sari kemudian dipisahkan dan diuapkan dengan evaporator sampai diperoleh ekstrak kental. ekstrak kental yang diperoleh dibuat seri konsentrasi 0,001%, 0,002%, 0,004%, 0,008% b/v.

### **Pembuatan blanko DPPH 0,1 mM**

Serbuk DPPH ditimbang sebanyak 3,9 mg dan dilarutkan dalam etanol p.a sampai tepat 100,0 mL (0,1 mM) (Nugraheni, 2007).

### **Pembuatan pembanding vitamin C**

Vitamin C sebanyak 0,5 mg ditambahkan air sampai 50,0 ml sehingga

diperoleh kadar 1%. Dari kadar ini dibuat seri konsentrasi sebesar 1, 2, 4 dan 8 µg/mL.

### **Penentuan panjang gelombang maksimal larutan DPPH 0,1 mM**

Penentuan panjang gelombang ( $\lambda$ ) dengan cara mengukur 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 400-600 nm untuk mendapatkan absorbansi  $\pm$  0,2-0,8 (Nugraheni, 2007).

### **Penentuan *operating time* larutan DPPH 0,1mM**

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mereaksikan 50 µl baku pembanding vitamin C ditambah 4,0 mL larutan DPPH 0,1 mM, dihomogenkan dengan stirer selama 1 menit dan diukur absorbansinya pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada  $\lambda$  maksimal yang sudah diperoleh (Nugraheni, 2007).

### **Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH**

Sebanyak 4,0 mL DPPH 0,1 mM dimasukkan tabung reaksi, tambahkan 50,0 µL ekstrak etanolik herba alfalfa dengan berbagai konsentrasi, kemudian distirer 1 menit sampai homogen dan diamkan selama 30 menit ditempat gelap, baca absorbansinya pada  $\lambda$  maksimal (525 nm). Untuk uji aktivitas baku pembanding vitamin C perlakuannya sama.

### **Uji kromatografi lapis tipis untuk identifikasi kandungan senyawa aktif dari ekstrak etanolik herba alfalfa (*Medicago sativa* L.)**

Bejana pengembang (chamber) dijenuhi dengan fase gerak yang sesuai untuk masing-masing golongan senyawa aktif. Fase gerak untuk vitamin C adalah kloroform-metanol (50:50), fase gerak flavonoid adalah etil asetat, asam formiat, asam asetat dan air (100:11:11:27). Totolkan ekstrak pada lempeng KLT (silika gel 60 F<sub>254</sub>) untuk vitamin C dan selulosa untuk flavonoid, pastikan ekstrak yang ditotolkan sampai kering. Kemudian lempeng KLT dielusi, dikeringkan kemudian dideteksi sinar UV  $\lambda$  254 nm dan 365 nm kemudian disemprot dengan penampak bercak untuk vitamin C adalah asam fosfomolibdat dan flavonoid adalah uap amoniak. Kemudian dihitung R<sub>f</sub>-nya.

**Analisis Data**

Data nilai absorbansi dari ekstrak etanolik herba alfalfa serta baku pembanding, dihitung dengan rumus:

% aktivitas antioksidan =  $\frac{\text{Absorbansi blanko (Absorbansi DPPH)} - \text{Absorbansi sampel (Absorbansi ekstrak etanolik herba alfalfa dan vitamin C)}}{\text{Absorbansi blanko (Absorbansi DPPH)}} \times 100\%$ . Data diolah menggunakan analisa probit antara log konsentrasi larutan uji (x) dengan persentase aktivitas antioksidan (y) sehingga diperoleh IC<sub>50</sub>. Untuk mengetahui perbedaan aktivitas antioksidan antara ekstrak etanolik herba alfalfa digunakan uji Tukey.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Identifikasi tanaman alfalfa**

Determinasi ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui bahwa buah yang akan digunakan dalam penelitian adalah benar-benar tanaman yang dimaksud. Adapun hasil determinasi dari tanaman alfalfa adalah sebagai berikut: 1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b –

20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27a – 28b – 29b – 30b – 31a – 32a – 33a – 34a – 35a – 36a – 37b – 38b – 39b – 41b – 42b – 43a - .....14, Medicago (Backer and Van de Brink).

**Pembuatan serbuk simplisia**

Penyerbukan simplisia bertujuan untuk memperluas permukaan dari simplisia, sehingga akan mempermudah kelarutannya.

**Ekstrak Etanolik Herba Alfalfa (*Medicago sativa* L.)**

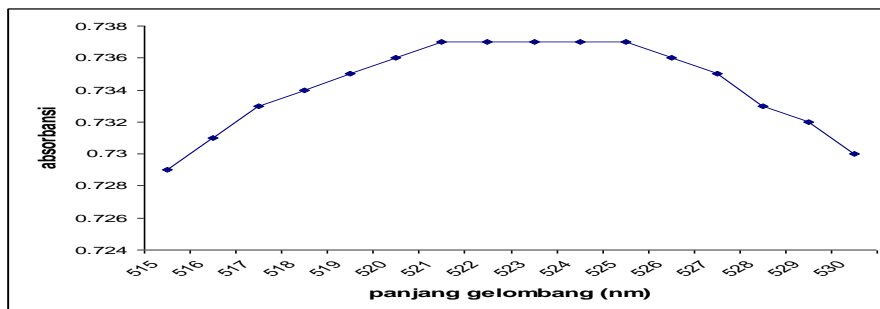
Ekstrak yang diperoleh dari proses maserasi adalah 32,65 gram dengan randemen 32,65%.

**Penentuan panjang gelombang (λ) maksimal larutan DPPH 0,1 mM**

Hasil penentuan panjang gelombang maksimal DPPH 0,1 mM pada nilai absorbansi tertinggi yaitu pada λ 525 nm, sehingga pengujian sampel dan kontrol positif dilakukan pada λ 525 nm (Gambar 1).

**Operating time vitamin C dengan DPPH 0,1 mM**

Hasil penentuan *operating time* vitamin C dengan DPPH 0,1 (Tabel I).



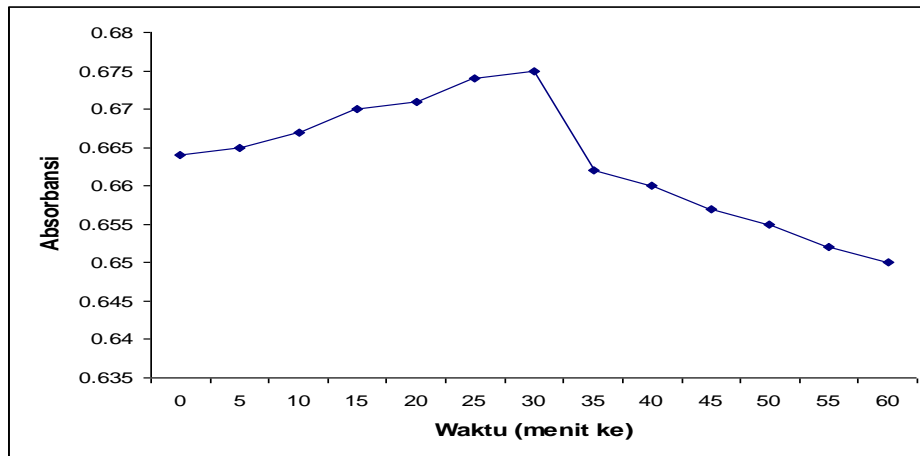
**Gambar I. Grafik penentuan panjang gelombang maksimal DPPH 0,1 mM**

**Tabel I. Penentuan *operating time* vitamin C dengan DPPH 0,1 mM**

Waktu (menit ke -)	Absorbansi
0	0,664
5	0,665
10	0,667
15	0,670
20	0,671
25	0,674
<b>30</b>	<b>0,675</b>
35	0,662
40	0,660
45	0,657
50	0,655
55	0,652
60	0,650

Tabel I (Gambar 2) menunjukkan bahwa *operating time* dengan serapan yang stabil terjadi pada absorbansi stabil yaitu pada menit ke 15 sampai 30. Maka pengujian aktivitas antioksidan dilakukan

pada menit ke 30 setelah dilakukan penambahan senyawa kompleks radikal bebas DPPH 0,1 mM dengan ekstrak herba alfalfa dan vitamin C



Gambar 2. Hasil penentuan *operating time* larutan DPPH 0,1mM

#### Uji aktivitas antioksidan

Hasil uji Aktivitas antioksidan perasan ekstrak etanolik herba alfalfa dengan metode DPPH dapat dilihat pada Tabel II di bawah ini.

Tabel II menunjukkan semakin besar konsentrasi maka aktivitas

antioksidannya juga semakin besar ditandai dengan perubahan warna dan nilai absorbansi. Senyawa yang dimungkinkan berperan sebagai antioksidan adalah flavonoid dan vitamin C (Gambar 3).

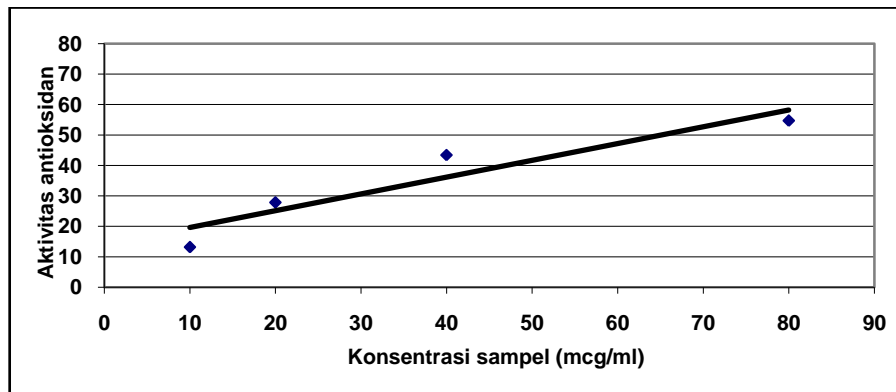
Tabel II. Aktivitas antioksidan perasan ekstrak etanolik herba alfalfa dengan metode DPPH

Sampel	Konsentrasi sampel (µg/ml)	Absorbansi*	Aktivitas antioksidan (%)*	Persamaan garis
Vitamin C	1	0,679	7,87	$Y = 8,5546x + 2,9952$ $r = 0,9853$
	2	0,589	20,08	
	4	0,415	43,69	
	8	0,231	68,66	
Ekstrak etanolik herba alfalfa	10	0,640	13,16	$Y = 0,5509x + 14,113$ $r = 0,9403$
	20	0,532	27,82	
	40	0,417	43,42	
	80	0,334	54,68	

Absorbansi blanko DPPH pada pengukuran aktivitas antioksidan = 0,737

Ket : \* = hasil tersebut merupakan hasil dari 3 kali pengukuran





Gambar 5. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak etanolik herba alfalfa ( $\mu\text{g/ml}$ ) dengan aktivitas antioksidan (%)

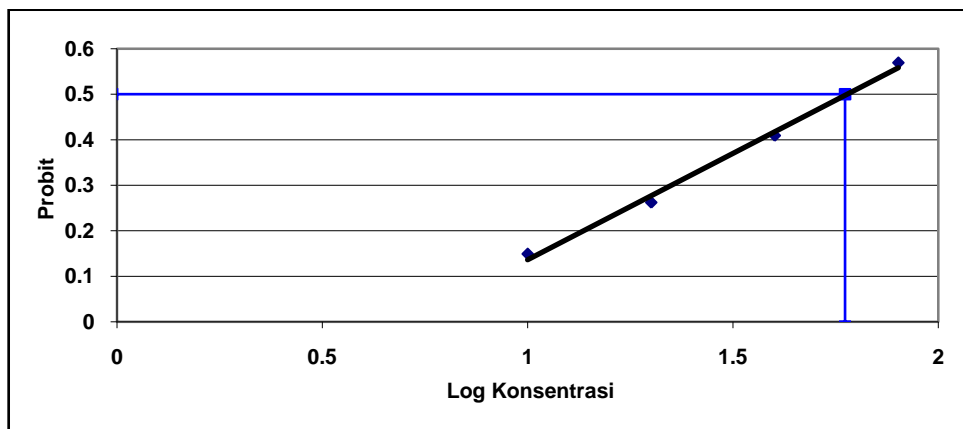
**Inhibition Concentration ( $\text{IC}_{50}$ )**

Nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanolik herba alfalfa dan vitamin C dapat dilihat pada Tabel III dibawah ini. Dari data pada Tabel III dibuat grafik hubungan antara log

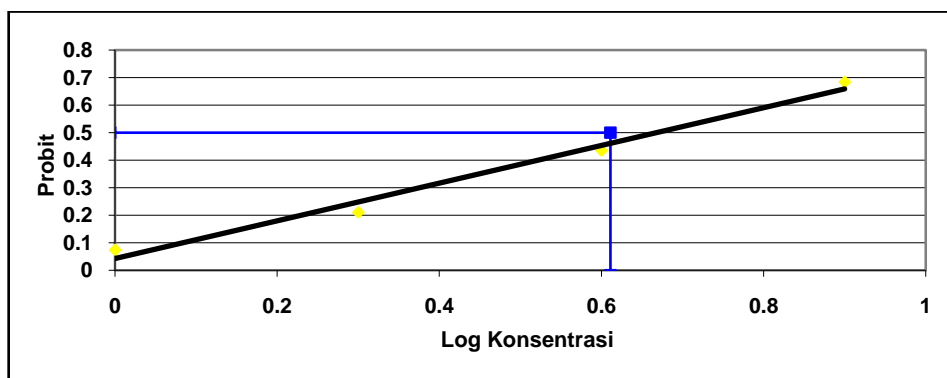
konsentrasi ekstrak etanolik herba alfalfa dengan hasil probit (Gambar 6), serta grafik hubungan antara log konsentrasi vitamin C dengan hasil probit (Gambar 7).

Tabel III. Nilai  $\text{IC}_{50}$  ekstrak etanolik herba alfalfa dan vitamin C

Sampel	Konsentrasi sampel ( $\mu\text{g/ml}$ )	Log konsentrasi	Probit	Nilai $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) $\pm$
Ekstrak etanolik herba alfalfa	10	1,000	0,149	$Y = 0,4674x - 0,3312$ $r = 0,997$ $\text{IC}_{50} = 59,339$
	20	1,301	0,262	
	40	1,602	0,409	
	80	1,903	0,569	
Vitamin C	1	0,000	0,074	$Y = 0,6827x + 0,0425$ $r = 0,992$ $\text{IC}_{50} = 4,768$
	2	0,301	0,210	
	4	0,602	0,435	
	8	0,903	0,684	



Gambar 6. Grafik hubungan antara log konsentrasi ekstrak dengan hasil probit



**Gambar 7. Grafik hubungan antara log konsentrasi vitamin C dengan hasil probit**

Dari data tabel III, menunjukkan bahwa besarnya konsentrasi sampel yang dapat menghambat 50% absorbansi DPPH ( $IC_{50}$ ) dengan taraf kepercayaan 95% adalah pada konsentrasi 59,339  $\mu\text{g/ml}$  untuk ekstrak etanolik herba alfalfa. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin kuat daya antioksidannya. Nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanolik herba alfalfa lebih besar dari nilai  $IC_{50}$  vitamin C yaitu sebesar 4,768  $\mu\text{g/ml}$ . Hal ini menunjukkan bahwa daya aktivitas antioksidan ekstrak etanolik herba alfalfa 10 kali lebih kecil dibanding dengan daya aktivitas antioksidan vitamin C dengan menggunakan metode DPPH.

Uji normalitas data dengan *Shapiro-Wilk* menunjukkan hasil yang signifikan. Hasil ini menunjukkan data homogen dan normal. Dari uji T diketahui bahwa perbedaan aktivitas antioksidan antara perasan tanaman alfalfa tidak signifikan dengan nilai signifikansi 0,971 ( $p > 0,05$ ).

**Uji kualitatif golongan senyawa aktif ekstrak herba alfalfa dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Dari Tabel IV menunjukkan bahwa golongan senyawa aktif dalam ekstrak etanolik herba alfalfa adalah flavonoid.

**Tabel IV. Nilai Rf golongan senyawa dalam ekstrak herba alfalfa**

No.	Pembanding	Rf	Golongan senyawa dalam sampel	Rf
1	Rutin	0,62	Flavonoid	0,76
2	Vitamin C	0,71	Vitamin C	Negatif

**KESIMPULAN**

1. Ekstrak etanolik herba alfalfa mempunyai aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.
2. Nilai  $IC_{50}$  dari ekstrak etanolik herba alfalfa sebesar 59,339  $\mu\text{g/ml}$  dan vitamin C 4,768  $\mu\text{g/ml}$ .
3. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanolik herba alfalfa adalah flavonoid.

**DAFTAR PUSTAKA**

Anonim, 2007, *Antiaging atau Antipenuaan*, <http://www.medicastore.com>, diakses tanggal 6 Maret 2008.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1986, *Sediaan Galenik*,

Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 8, 12, 13, 16.

Hanani, E., Mun'im, A., dan Sekarini, R., 2005, Identifikasi Senyawa Antioksidan dalam Spons *Callyspongia SP* dari Kepulauan Seribu, *Majalah Ilmu Kefarmasian*, 2, 3, 130.

Jork, H., Funk, W., Fischer, W., and Wimmer, H., 1990, *Thin Layer Chromatography Reagents and Detection Methods*, Volume 1a, VCH, New York,

Kumalaningsih, S., 2006, *Antioksidan Alami Penangkal Radikal Bebas*, Trubus



- Agrisarana, Surabaya, 17-21, 34-35, 40.
- Mursyidi, 1984, *Statistika Farmasi dan Biologi*, Gratia Indonesia, 20.
- Molyneux, P., 2004, The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicrilhidrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity, *J. Sci. Techn*, **26** (2), 211-219.
- Nugraheni, 2007, Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol dan Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sunchus arvensis* L.) serta Penentuan EC<sub>50</sub> dengan Metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil), *Skripsi*, 36-39, Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi, Semarang.
- Voigt, 1995, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*, diterjemahkan oleh Soendari Noerrono Soewandi, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 25.
- Wagner, H., 1984, *Plant Drug Analysis a Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Verlag, 164.