

PENGARUH pH TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN MIANA (*Coleus atropurpureus* L. Benth)

Fitri Eka Giuliana^{1,*}, Mirhansyah Ardana¹, Rolan Rusli^{1,2,†}

¹Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Kefarmasian “Farmaka Tropis”,
Fakultas Farmasi, Universitas Mulawarman, Samarinda

*Email : giu.gmbel@gmail.com

²Kelompok Bidang Ilmu Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas
Mulawarman, Samarinda

†Email: rolan@farmasi.unmul.ac.id

ABSTRACT

Ethanol extract of the leaves miana has good antioxidant activity with IC₅₀ value was 48.04 ppm. Stability of antioxidants can be affected by several factors such as oxygen, light, pH, and temperature. Effect of pH on the antioxidant activity can be viewed by using citrate buffer pH 3, 4 and 5.3 and citrate – Phosphate buffer pH 3, 4, 5.3, 6, 7 and 8. Test of antioxidant activity with DPPH method (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) using a UV-Vis spectrophotometer produce the most good IC₅₀ values at pH 4 with citrate buffer (IC₅₀ 29.97 ppm) and Citrate - Phosphate buffer (IC₅₀ 30.88 ppm).

Key words: *Coleus atropurpureus* L. Benth., Antioxidant, DPPH, IC₅₀.

ABSTRAK

Ekstrak etanol daun miana memiliki aktivitas antioksidan yang baik dengan nilai IC₅₀ 48,04 ppm. Stabilitas dari antioksidan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti oksigen, cahaya, pH, dan suhu. Pengaruh pH terhadap aktivitas antioksidan dilihat dengan menggunakan buffer Sitrat pH 3, 4 dan 5,3 serta buffer Sitrat – Fosfat pH 3; 4; 5,3; 6; 7; dan 8. Uji terhadap aktivitas antioksidan dengan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan nilai IC₅₀ yang paling baik pada pH 4 dengan buffer Sitrat (IC₅₀ 29,97 ppm) dan dengan buffer Sitrat – Fosfat (IC₅₀ 30,88 ppm).

Kata kunci: *Coleus atropurpureus* L. Benth., Antioksidan, DPPH, IC₅₀.

PENDAHULUAN

Kesehatan merupakan hal terpenting dan utama dalam kehidupan manusia. Perkembangan industri dan gaya hidup manusia menimbulkan berbagai dampak, baik dampak positif maupun negatif. Salah satu dampak negatif yang perlu diwaspadai adalah timbulnya berbagai penyakit degeneratif [1]. Penyakit degeneratif diakibatkan proses metabolisme tubuh yang menghasilkan radikal bebas berlebihan sehingga menyebabkan kerusakan pada fungsi sel-sel tubuh [2].

Radikal bebas adalah atom yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan di kulit terluar sehingga sangat reaktif dan mampu bereaksi dengan lipid, protein, karbohidrat atau DNA. Senyawa radikal bebas meliputi hidroksil, anion superoksida, hidrogen peroksida, asam hipoklorat, oksigen singlet, dan peroksil [3]. Pengaruh negatif radikal bebas ini dapat dihambat oleh adanya antioksidan. Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan mencegah terbentuknya radikal. Secara biologis, pengertian antioksidan adalah senyawa yang mampu menangkal atau meredam dampak negatif oksidasi dalam tubuh. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektronnya kepada senyawa yang bersifat oksidasi sehingga aktivitas senyawa oksidasi tersebut bisa dihambat [4].

Beberapa antioksidan dapat dihasilkan dari produk alami, seperti dari rempah-rempah, teh, coklat, dedaunan, biji-biji serelia, sayur-sayuran, enzim dan protein. Kebanyakan sumber antioksidan alami berasal dari tanaman dan umumnya merupakan senyawa fenolik yang tersebar di seluruh bagian tanaman baik di kayu, biji, daun, buah, akar, bunga maupun serbuk sari. Diketahui hampir 80 persen dari total antioksidan dalam buah dan sayuran berasal dari flavonoid, yang dapat berfungsi sebagai penangkap anion superoksida, lipid peroksida radikal, kuensing oksigen singlet, dan pengkelat logam [5]. Daun miana (*Coleus atropurpureus* L. Benth.) mengandung flavonoid dengan aktivitas antioksidan yang cukup tinggi dimana IC_{50} yang dimiliki pada ekstrak etanolnya yaitu 48,04 ppm [6]. Corak, bentuk, dan warna miana beranekaragam, tetapi yang berkhasiat obat adalah daun yang berwarna merah kecoklatan [7].

Stabilitas dari antioksidan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti oksigen, cahaya, pH, dan suhu. Suhu memiliki peranan dan pengaruh yang sangat penting terhadap kestabilan antosianin. Menurut Hendry dan Houghton (1996), suhu penyimpanan maupun suhu proses pengolahan mempengaruhi degradasi antosianin [8]. Jadi, pada suhu pengolahan yang tinggi dan selama penyimpanan akan menyebabkan degradasi antosianin [9] begitu pun dengan pengaruh pH salah satu contohnya adalah senyawa antosianin delphinidin yang terkandung dalam bunga rosella yang dapat larut dalam asam dan tidak stabil dalam larutan netral atau basa [10]. Antosianin merupakan salah satu senyawa yang menghasilkan efek antioksidan dan juga merupakan komponen kimia yang terdapat pada tanaman miana [11]. Berdasarkan uraian di atas maka dilakukan uji pengaruh pH terhadap aktivitas antioksidan ekstrak daun miana.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu berupa daun miana, etanol 96%, air suling, asam sitrat, natrium sitrat, Na₂HPO₄, dan DPPH.

Peralatan

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini yaitu timbangan analitik, *rotary evaporator*, tabung reaksi bertutup, sonikator, kuvet kuarsa, mikropipet, *vortex*, pH meter, spektrofotometer UV Vis *double beam* (HALO DB-20S), labu ukur coklat, pipet ukur, pipet volume dan peralatan kaca lain yang umum yang digunakan di laboratorium.

Prosedur

Pengumpulan Sampel

Sampel merupakan daun miana yang diperoleh dari Kecamatan Samarinda Seberang Kelurahan Mangkupalas.

Ekstraksi

Simplisia daun miana (*Coleus atropurpureus* L. Benth.) dimasukkan ke dalam wadah maserasi. Kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%, dan didiamkan selama 3 hari. Maserat (hasil maserasi) dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental etanol.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Miana

Aktivitas antioksidan ditentukan dari nilai IC₅₀ yang dihitung dengan menggunakan metode DPPH dengan alat spektrofotometer UV Vis. Terlebih dahulu dibuat buffer Sitrat pH 3, 4, dan 5,3 dan buffer Sitrat – Fosfat pH 3; 4; 5,3; 6; 7 dan 8 sebagai pengatur suasana asam, netral dan basa pada ekstrak etanol daun miana. Ekstrak etanol daun miana dibuat 5 seri konsentrasi yaitu 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm dengan melarutkannya menggunakan etanol sebanyak 5 % terlebih dahulu kemudian ditambah buffer sesuai pH masing-masing. Ke 5 seri konsentrasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup dan ditambahkan DPPH (40 ppm) kemudian didiamkan selama 30 menit lalu ditentukan serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Hasil serapan digunakan untuk menghitung persen peredaman radikal bebas kemudian dimasukkan ke dalam persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier sehingga didapatkan nilai IC₅₀.

Perhitungan persen peredaman dengan menggunakan rumus [12]:

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

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengamatan serapan dan peredaman radikal bebas ekstrak etanol daun miana pada konsentrasi 10, 30, 50, 70 dan 90 ppm dengan buffer Sitrat disajikan dalam tabel 1 serta serapan dan peredaman radikal bebas ekstrak etanol daun miana pada konsentrasi 10, 30, 50, 70, dan 90 ppm dengan buffer Sitrat – Fosfat disajikan dalam tabel 2.

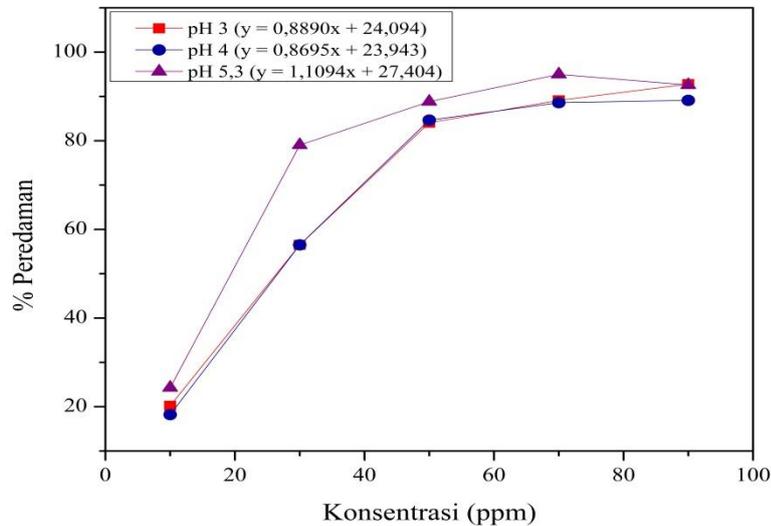
Hasil peredaman digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan (IC_{50}). Analisis nilai IC_{50} dihitung berdasarkan persamaan regresi linier yang didapatkan dengan memplot konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH sebagai parameter aktivitas antioksidan. Konsentrasi larutan uji sebagai absis dan persen peredaman sebagai ordinat [13]. Hasil persamaan regresi linier yang diperoleh untuk ekstrak etanol daun miana dengan buffer Sitrat disajikan dalam gambar 1 serta hasil persamaan regresi linier yang diperoleh untuk ekstrak etanol daun miana dengan buffer Sitrat– Fosfat disajikan dalam gambar 2.

Tabel 1. Nilai Serapan dan Peredaman Ekstrak Etanol daun Miana dengan Buffer Sitrat

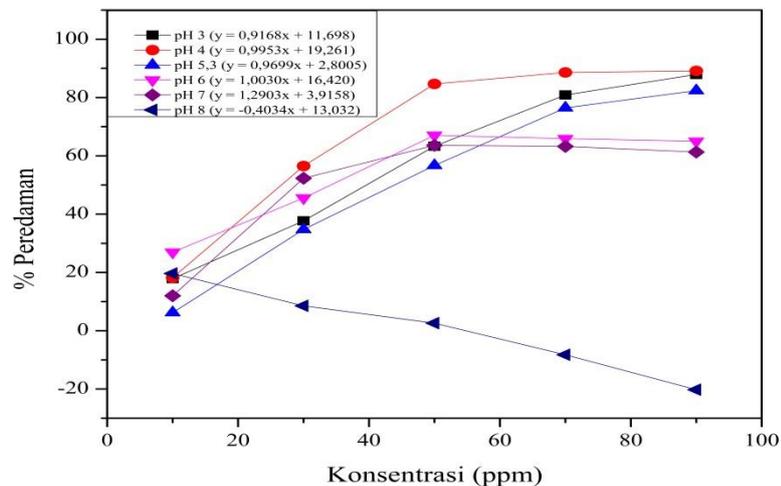
pH	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi				Peredaman (%)
		1	2	3	Rata-rata	
3	DPPH	0,653	0,653	0,653	0,653	-
	10	0,510	0,524	0,529	0,521	20,21
	30	0,293	0,278	0,281	0,284	56,51
	50	0,103	0,108	0,100	0,104	84,07
	70	0,061	0,084	0,068	0,071	89,13
	90	0,045	0,048	0,047	0,047	92,80
4	DPPH	0,736	0,736	0,736	0,736	-
	10	0,595	0,601	0,609	0,602	18,21
	30	0,321	0,320	0,319	0,320	56,52
	50	0,116	0,110	0,112	0,113	84,65
	70	0,082	0,086	0,084	0,084	88,59
	90	0,080	0,080	0,079	0,080	89,13
5,3	DPPH	0,877	0,877	0,877	0,877	-
	10	0,660	0,666	0,665	0,664	24,29
	30	0,117	0,216	0,219	0,184	79,02
	50	0,094	0,099	0,101	0,098	88,83
	70	0,044	0,037	0,052	0,044	94,98
	90	0,045	0,096	0,054	0,065	92,59

Tabel 2. Nilai Serapan dan Peredaman Ekstrak Etanol daun Miana dengan Buffer Sitrat-Fosfat

pH	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi				Peredaman (%)
		1	2	3	Rata-rata	
3	DPPH	0,812	0,812	0,812	0,812	-
	10	0,631	0,708	0,664	0,667	17,86
	30	0,525	0,505	0,489	0,506	37,69
	50	0,295	0,290	0,311	0,298	63,30
	70	0,164	0,139	0,164	0,115	80,91
	90	0,091	0,120	0,085	0,098	87,93
4	DPPH	0,736	0,736	0,736	0,736	-
	10	0,595	0,601	0,609	0,602	18,21
	30	0,321	0,320	0,319	0,320	56,52
	50	0,116	0,110	0,112	0,113	84,65
	70	0,082	0,086	0,084	0,084	88,59
	90	0,080	0,080	0,079	0,080	89,13
5,3	DPPH	0,901	0,901	0,901	0,901	-
	10	0,843	0,845	0,847	0,845	6,22
	30	0,587	0,588	0,589	0,588	34,74
	50	0,413	0,379	0,378	0,390	56,71
	70	0,211	0,212	0,213	0,212	76,47
	90	0,156	0,161	0,161	0,159	82,35
6	DPPH	0,683	0,683	0,683	0,683	-
	10	0,450	0,449	0,449	0,499	26,94
	30	0,372	0,369	0,374	0,372	45,53
	50	0,218	0,227	0,230	0,225	67,06
	70	0,231	0,230	0,238	0,233	65,89
	90	0,230	0,243	0,244	0,239	65,01
7	DPPH	0,868	0,868	0,868	0,868	-
	10	0,750	0,771	0,771	0,764	11,98
	30	0,425	0,419	0,398	0,414	52,30
	50	0,322	0,319	0,309	0,316	63,59
	70	0,303	0,325	0,329	0,319	63,25
	90	0,337	0,336	0,337	0,336	61,29
8	DPPH	0,577	0,577	0,577	0,577	-
	10	0,456	0,464	0,471	0,464	19,65
	30	0,525	0,534	0,524	0,528	8,56
	50	0,562	0,562	0,562	0,562	2,59
	70	0,624	0,625	0,624	0,624	-8,25
	90	0,697	0,689	0,695	0,694	-20,21



Gambar 1. Persamaan regresi linier dan hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun miana terhadap persen peredaman dengan buffer Sitrat



Gambar 2. Persamaan regresi linier dan hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun miana terhadap persen peredaman dengan buffer Sitrat – Fosfat

Berdasarkan persamaan regresi yang telah diperoleh, maka nilai IC_{50} dapat dihitung dengan menentukan konsentrasi sampel uji yang menyebabkan persentase peredaman sebesar 50% [13]. Nilai IC_{50} dari ekstrak etanol daun miana dengan buffer Sitrat dan buffer Sitrat – Fosfat disajikan dalam tabel 3.

Tabel 3. Nilai IC₅₀ Ekstrak daun Miana dengan Buffer Sitrat dan Buffer Sitrat-Fosfat

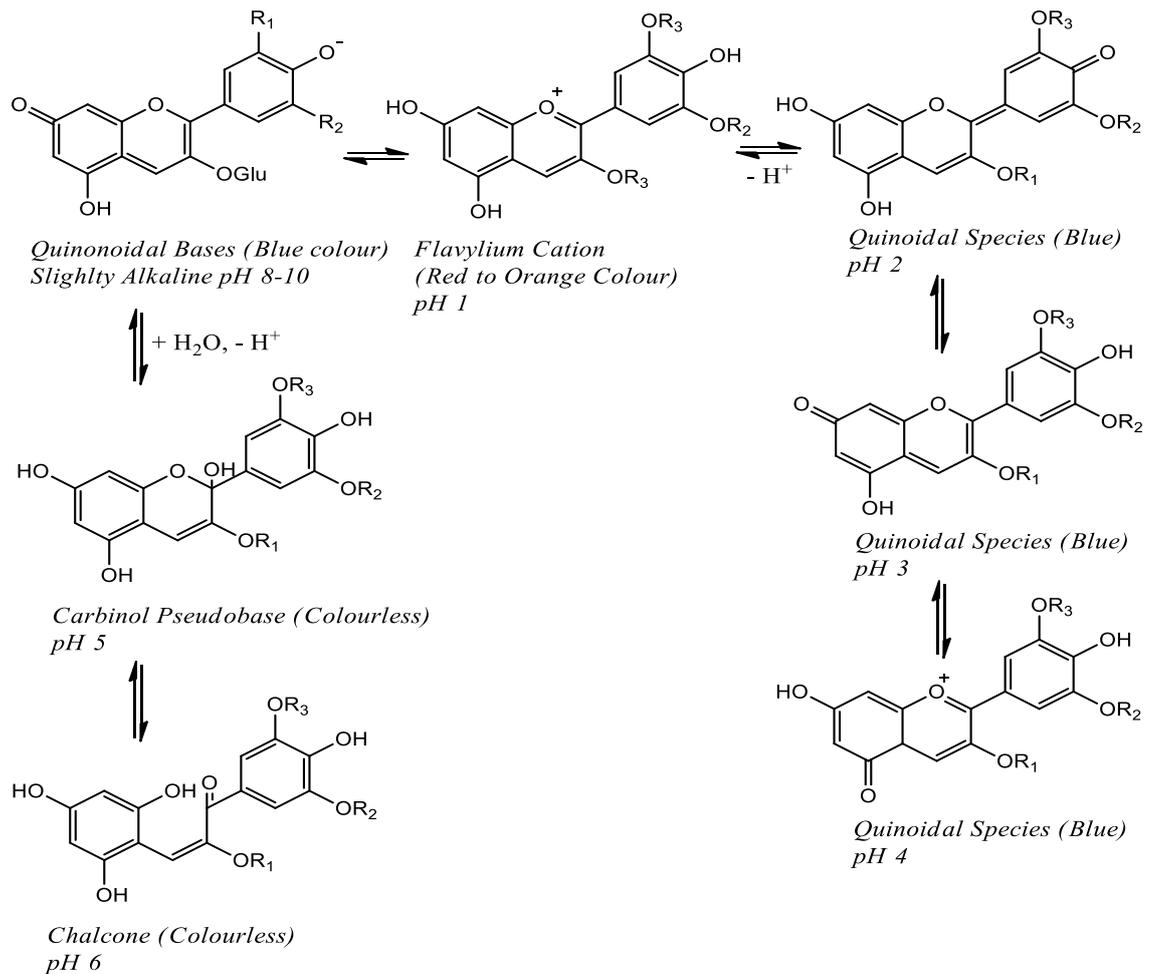
Buffer	pH					
	3	4	5,3	6	7	8
Sitrat	29,14 ppm	29,97 ppm	20,37 ppm	-	-	-
Sitrat – Fosfat	41,78 ppm	30,88 ppm	48,66 ppm	34,48 ppm	35,72 ppm	-91,64 ppm

Berdasarkan tabel 3 dapat diketahui bahwa perbedaan pH serta buffer mempengaruhi aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun miana. Pengaruh perbedaan pH dan buffer dapat dilihat dari nilai IC₅₀. Secara spesifik, suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC₅₀ kurang dari 50 µg/mL, kuat untuk IC₅₀ bernilai 50-100 µg/mL, sedang jika IC₅₀ bernilai 100-150 µg/mL, dan lemah jika IC₅₀ bernilai 151-200 µg/mL [13]. Jika dibandingkan tanpa menggunakan medium pH (IC₅₀ 48,04 ppm) pada buffer Sitrat pH 3 dan 4 menunjukkan hasil nilai IC₅₀ yang lebih baik, tetapi pada pH 5,3 terjadi penurunan persen peredaman pada konsentrasi 90 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada pH 5,3 aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun miana menjadi berkurang. Hal ini dikarenakan, senyawa metabolit sekundernya yang aktif sebagai antioksidan mulai tidak stabil.

Pada buffer Sitrat – Fosfat pH 3 dan 4 juga menunjukkan hasil nilai IC₅₀ yang lebih baik daripada tanpa menggunakan medium pH. Pada pH 5,3 aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun miana masih baik walaupun nilai IC₅₀ tidak jauh berbeda dengan nilai IC₅₀ tanpa menggunakan medium pH. Seperti halnya pada pH 5,3 dengan buffer Sitrat, pH 6 dan 7 pada buffer Sitrat – Fosfat juga mengalami penurunan persen peredaman pada konsentrasi tinggi yaitu 70 ppm dan 90 ppm. Sedangkan pada pH 8 aktivitas antioksidan menunjukkan hasil yang sangat tidak baik dimana semakin besar konsentrasi maka persen peredaman antioksidan semakin menurun. Hal ini disebabkan karena, senyawa metabolit sekundernya yang aktif sebagai antioksidan tidak stabil pada pH tinggi atau terjadi perubahan struktur dari senyawa aktif yang ada.

Daun miana memiliki antosianin yang merupakan salah satu kelompok senyawa flavonoid yang berperan memberikan warna ungu pada tanaman dan juga menghasilkan efek antioksidan. Senyawa antosianin yang terdapat pada daun miana adalah senyawa pelargonidin-3-rutinosida dan sianidin-3-O-glukosida [11]. Di dalam larutan, antosianin berada dalam lima bentuk kesetimbangan tergantung pada kondisi pH. Kelima bentuk tersebut yaitu kation flavilium, basa karbinol, kalkon, basa quinonoidal, dan quinonoidal anionik. Pada kondisi asam (pH <2) antosianin berada dalam bentuk ion oxonium atau garam flavilium yang cenderung lebih stabil. Pada nilai pH kisaran 2 – 4 terbentuk spesies quinoidal

berwarna biru. Bentuk tersebut dapat mengalami hidrolisis dengan meningkatnya pH membentuk pseudobasa yang mulai kehilangan warna yaitu bentuk basa karbinol pada pH 5 dan bentuk kalkon pada pH 6. Pada pH di atas 7 akan membentuk basa quinonoidal berwarna biru [14]. Bentuk kesetimbangan antosianin dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Bentuk struktur dominan antosianin pada tingkat pH yang berbeda (R1 = H atau glikosida, R2 dan R3 = H atau kelompok metil) [14]

Antosianin merupakan salah satu senyawa yang reaktif akibat kekurangan elektron dan hanya stabil pada kondisi asam [15]. Hasil penelitian (Laleh, 2006) menunjukkan bahwa peningkatan pH menyebabkan degradasi yang besar dari antosianin dalam sampel. Garam flavilium stabil hanya dalam kondisi yang sangat asam. Garam-garam ini kehilangan proton pada pH yang lebih tinggi dan berubah menjadi basis quinoidal, yang merupakan pigmen yang tidak stabil, dan segera berikatan dengan air dan membentuk senyawa tidak berwarna yang disebut

chromenol [16]. Hal inilah yang menyebabkan pada buffer Sitrat dan buffer Sitrat–Fosfat pH 3 dan 4 menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih baik dibandingkan dengan pH 5,3; 6; 7 dan 8. pH yang paling baik untuk ekstrak etanol daun miana adalah pH 4 dengan buffer Sitrat maupun dengan buffer Sitrat – Fosfat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa perbedaan pH dan buffer mempengaruhi aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun miana menunjukkan nilai yang baik pada suasana asam. Nilai IC₅₀ yang baik ialah pada pH 4 dengan buffer Sitrat maupun dengan buffer Sitrat – Fosfat.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wanti, Surtika. 2008. *Pengaruh Berbagai Jenis Beras Terhadap Aktivitas Antioksidan pada Angkak oleh Monascus purpureus*. Universitas Sebelas Maret: Surakarta.
2. Helliwel, B. and Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press: New York.
3. Hernani dan Rahardjo, R. 2006. *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Swadaya: Jakarta. 48-49.
4. Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas Potensi dan Aplikasi dalam Kesehatan*. Kanisius: Yogyakarta.
5. Ahmad, Ahyar and Muh. Nasrum Massi. 2014. The Antituberculosis Rifampicin is Activated by 2',5'-Dimethyl Benzopelargonolactone from The Leaf *Coleus atropurpureus L.*, Benth. *International Journal of Pharma and Bio Science*. **5**(1). (B) 758-764.
6. Sari, Devi. D. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Miana (Coleus atropurpureus) Terhadap DPPH*. Universitas Mulawarman: Samarinda.
7. Dalimartha, S. 2007. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid I*. Trubus Agriwidya: Jakarta.
8. Hendry, G. A. F. and Houghton, J. D. 1996. *Natural Food Colorant Second Edition*. Blackie Academic and Professional: London.
9. Hayati, E. K., Budi, U. S., dan Hermawan, R. 2012. Konsentrasi Total Senyawa Antosianin Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*): Pengaruh Temperatur dan pH. *Jurnal Kimia* .**6** (2). 138-147.
10. Setiono, Monica. H. 2013. Penentuan jenis Solven dan pH Optimum pada Analisis Senyawa Delphinidin dalam Kelopak Bunga Rosela dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Teknik Kimia dan Industri*. **2** (2). 91-96.
11. Hardiyanti, Yuniar., Djaswir Darwis dan Adlis Santoni. 2013. Ekstraksi dan Uji Antioksidan senyawa Antosianin dari Miana (*Coleus scutellarioides L.* (Benth)) Serta Aplikasi pada Minuman. *Jurnal Kimia Unand*. **2** (2). 44-50.

12. Prakash, A., Rigelhof, F., Miller, E. 2001. *Antioxidant Activity*, dalam Rahayu. 2010. *Penentuan Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Daun Ketapang (Terminalia catappa L) dengan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH)*. Universitas Diponegoro: Semarang.
13. Martiningsih, N. W., I Nyoman S., Putu E. Y. 2014. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Buah Terong Ungu (*Solanum melongena* L.). *Jurnal Kimia*. **8** (2). 145-152.
14. Miguel, M. G. 2011. Anthocyanins: Antioxidant and/or anti-inflammatory activities. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **01** (06). 2.
15. Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB: Bandung.
16. Laleh, G. H., H. Frydoonfar., and S. Zare. 2006. The Effect of Light, Temperature, pH and Spesies on Stability of Anthocyanin Pigments in Four Berberies Species. *Pakistan Journal of Nutrition*. **5** (1). 90-92.