

Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Daun Kedondong (*Spondias dulcis*) Melalui Penangkal Radikal Superoksida

Antioxidant Activity of Ambarella (Spondias dulcis) Leaf Extract Through Superoxide Radical Scavenging

Ucu Wandu Somantri¹, Tarso Rudiana^{2,*}, Prasetyo Alfaridzi Kuncoroyekti³

¹Program Studi Kesehatan Masyarakat, Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan, Universitas Mathla'ul Anwar

²Program Studi Kimia, Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan, Universitas Mathla'ul Anwar

³Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta

*E-mail: tarso.rudiana@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.26874/jkk.v5i2.168>

Received: 29 August 2022, Revised: 3 Oct 2022, Accepted: 10 Oct 2022, Online: 30 Nov 2022

Abstrak

Kedondong (*Spondias dulcis*) merupakan tumbuhan tropis yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan ekstrak *n*-heksana, etil asetat dan metanol daun *S. dulcis* melalui penangkal radikal superoksida serta mengkarakterisasi senyawa fitokimia pada ekstrak dengan LCMS/MS. Serbuk daun *S. dulcis* dimaserasi dengan *n*-heksana, etil asetat dan metanol. Aktivitas antioksidan diuji melalui penangkal radikal superoksida. Ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis* memiliki aktivitas antioksidan terbaik dengan nilai IC₅₀ sebesar 2080 µg/mL. Berdasarkan LCMS/MS terdeteksi 6 senyawa pada ekstrak *n*-heksana yaitu pada waktu retensi (*Rt*) 3,23-9,89 menit. Senyawa ajmalin, skopoletin, skoparon, 3-metil-6-[[2-(2-metilbut-3-en-2-yl)-1H-indol-3-yl] metiliden] piperazin-2,5-dion, [3-hidroksi-3-metilbut-1-enil]-5,7-dimetoksi-2-fenil-2,3-dihidrokromen-4-on, dan 4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]etanon.

Kata kunci: antioksidan, *n*-heksana, *Spondias dulcis*, superoksida.

Abstract

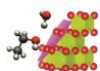
Ambarella (Spondias dulcis) is a tropical plant which is known to have antioxidant activity. This study aims to determine the antioxidant activity of the n-hexane, ethyl acetate and methanol extracts of S. dulcis leaves through superoxide radical scavenging and to characterize the phytochemical compounds in the extract using LCMS/MS. S. dulcis leaf powder was macerated with n-hexane, ethyl acetate and methanol. Antioxidant activity was tested through superoxide radical scavengers. The n-hexane extract of S. dulcis leaves had the best antioxidant activity with an IC₅₀ value of 2080 µg/mL. Based on LCMS/MS, 6 compounds were detected in the n-hexane extract at retention time (Rt) 3.23-9.89 minutes. Compounds Ajmalin, Scopoletin, scoparone, 3-methyl-6-[[2-(2-methylbut-3-en-2-yl)-1H-indole-3-yl] methylidene]piperazine-2,5-dione, [3-hydroxy-3-methylbut-1-enyl]-5,7-dimethoxy-2-phenyl-2,3-dihydrochromene-4-one, and 4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl jethanone.

Keywords: antioxidant, *n*-hexane, *Spondias dulcis*, superoxide

1 Pendahuluan

Sistem kekebalan tubuh sangat sensitif terhadap stres oksidatif yang diakibatkan oleh ketidakseimbangan radikal bebas dalam tubuh [1,2]. Sel-sel imun sangat bergantung pada

komunikasi sel-selnya, terutama melalui reseptor yang terikat membran untuk bekerja secara efektif. Radikal bebas yang dihasilkan dari peroksidasi lipid dapat ditunda atau dicegah dengan senyawa antioksidan [1]. Antioksidan



dapat meningkatkan produksi interleukin-2, meningkatkan jumlah subset sel T, berpotensi sebagai sel pembunuh alami, meningkatkan respons terhadap vaksin virus influenza dan meningkatkan respon limfosit terhadap mitogen [3].

Indonesia merupakan negara dengan biodiversitas tinggi memiliki banyak tanaman dengan potensi sebagai tanaman obat, kedondong (*Spondias dulcis*) merupakan salah satunya. Genus *Spondias* mengandung senyawa fitokimia seperti saponin, sterol, tanin, triterpenoid, fenolik dan flavonoid [4]. Fenolik merupakan golongan senyawa sekunder terbesar yang ditemukan pada tanaman dengan beragam aktivitas biologis seperti antioksidan.

Berbagai penelitian telah dilakukan terkait pengujian antioksidan terhadap tanaman genus *Spondias*. Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan terhadap ekstrak etanol yang berasal dari berbagai bagian tanaman *S. dulcis* diperoleh nilai IC_{50} yaitu daging buah, kulit batang dan daun masing-masing sebesar 19,109; 17,609; dan daun 13,687 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [5]. Ekstrak metanol daun *S. dulcis* memiliki total flavonoid dan fenolik paling tinggi dibandingkan jaringan lain yaitu sebesar 33,96 mg kuersetin/g dan 16,35 GAE/g [5,6], sedangkan pada ekstrak kloroform daun *S. dulcis* memiliki nilai IC_{50} sebesar 8,96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [6].

Eksplorasi senyawa metabolit sekunder serta aktivitas terhadap antioksidan terutama enzim SOD dari daun *S. dulcis* belum banyak dilaporkan. Pada penelitian ini dilakukan eksplorasi potensi antioksidan dari daun *S. dulcis* sebagai peningkat sistem imun di masa *new normal* secara *in vitro* melalui penangkal radikal superoksida, sehingga diharapkan dapat dijadikan sebagai sediaan farmasi dan dapat dijadikan sebagai senyawa rujukan dalam isolasi dan pengembangan.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

LCMS/MS (Acquaty UPLC[®]H-Class System, BEH C18, Xevo G2-S QToF), *multimode microplate reader*, *rotary vacuum evaporator*, berbagai alat gelas laboratorium. Daun kedondong (*S. dulcis*), *n*-heksana, kloroform, etanol 96%, etil asetat, metanol, *nitroblue tetrazolium chloride* (NBT) 98%, buffer fosfat 1,0 M pH 7,4 (25°C), *tetramethylethyldiamine* (TEMED) 99%, riboflavin 98%, dan akuabides.

2.2 Ekstraksi Daun *S. dulcis*

Daun *S. dulcis* sebanyak 20 kg dikumpulkan dari Kabupaten Pandeglang Banten. Sampel

dipersiapkan dengan cara dibersihkan, dikeringkan, dan dihaluskan. Pelarut *n*-heksana, etil asetat dan metanol digunakan sebagai pelarut pada proses maserasi serbuk halus daun *S. dulcis*. Maserat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*.

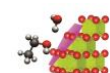
2.3 Uji *in vitro* aktivitas antioksidan SOD [7]

Uji aktivitas SOD diawali dengan pembuatan larutan sampel dengan variasi konsentrasi 100; 20; 10; 7; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5 μM . Selanjutnya dilakukan pembuatan larutan reagen NBT 10 mM, larutan Riboflavin 0,5 mM, larutan buffer fosfat pH 7,4 1 M dan larutan TEMED 0,1 M. Berikutnya dilakukan uji pendahuluan dimana campuran larutan sampel dengan NBT diukur absorbansinya dengan menggunakan *microplate reader* (450-560 nm).

Selanjutnya dibuat larutan kerja 1 dan 2. Larutan kerja 1 dibuat dengan menambahkan 320 μL larutan buffer fosfat, 170 μL larutan NBT, 160 μL larutan TEMED dan 240 μL larutan Riboflavin ke dalam 19.110 μL akuades. Larutan kerja 2 dibuat dengan menambahkan 320 μL larutan buffer fosfat, 170 μL larutan NBT, dan 160 μL larutan TEMED tanpa riboflavin ke dalam 19.110 μL akuades. Larutan uji dibuat sebanyak 4 yaitu larutan S, B1, B2, dan B3. Larutan uji S dibuat dengan menambahkan 40 μL larutan sampel dengan 200 μL larutan kerja 1. Larutan uji B1 dibuat dengan menambahkan 40 μL metanol dengan 200 μL larutan kerja 1. Larutan uji B2 dibuat dengan menambahkan 40 μL larutan sampel dengan 200 μL larutan kerja 2. Larutan uji B3 dibuat dengan menambahkan 40 μL metanol dengan 200 μL larutan kerja 2. Absorbansi larutan uji diukur pada *microplate reader* (560 nm), lalu dihitung nilai IC_{50} aktivitas SOD.

2.4 Karakterisasi ekstrak [8]

Ekstrak dengan aktivitas terbaik dianalisis dengan LCMS/MS. Ekstrak dilarutkan dengan pelarut yang sesuai. Larutan ekstrak sebanyak 20 μL disuntikan pada kolom C18 (RP18) superco (diameter 2,1 mm, panjang 50 mm, ukuran partikel 1,8 μm), sistem *Electrospray Ionisation* (ESI) model ion positif. Kecepatan alir fasa gerak 0,3 mL/menit (metanol:air (9:1)



3 Hasil dan Diskusi

3.1 Ekstrak daun *S. dulcis*

Senyawa fitokimia yang terkandung pada daun *S. dulcis* terekstrak melalui proses maserasi dengan bantuan pelarut senyawa organik. Hal ini dikarenakan pelarut organik dapat memecahkan dinding dan membran sel [9].

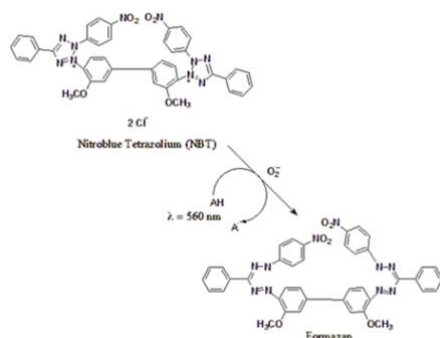
Pelarut *n*-heksana digunakan di awal proses maserasi hal ini dilakukan untuk menarik senyawa-senyawa yang bersifat non-polar seperti sterol, asam lemak, kumarin, dan beberapa terpenoid [10]. Selanjutnya maserasi menggunakan etil asetat untuk menarik senyawa fitokimia semipolar seperti flavonoid termetilasi, flavonoid aglikon, beberapa alkaloid dan tanin dan tahapan terakhir maserasi menggunakan metanol untuk mengekstrak senyawa polar seperti fenolik, flavonoid dan alkaloid [11]. Berikut disajikan data % rendemen dari masing-masing ekstrak:

Tabel 1. Data rendemen ekstrak

Ekstrak	Massa (g)	% rendemen
<i>n</i> -heksana	200,5	3,71
Etil asetat	168,95	3,12
Metanol	150,56	2,78

3.2 Aktivitas antioksidan Ekstrak Daun *S. dulcis*

Aktivitas antioksidan ekstrak daun *S. dulcis* dianalisis dengan metode *Riboflavin-Nitrobluetetrazolium* (Rb-NBT) dimana cara kerjanya seperti enzim superoksida dismutase (SOD). Metode uji antioksidan ini bekerja dengan menangkalkan radikal bebas anion superoksida ($O_2^{\cdot-}$). Radikal superoksida akan bereaksi dengan *nitrobluetetrazolium* dan diukur serapan kompleksnya pada panjang gelombang 560 nm (Gambar 1) [12]. Radikal anion superoksida adalah prekursor pembentukan spesi oksigen reaktif lainnya (ROS). Oleh karena itu penangkalan radikal superoksida sangat penting agar dapat mencegah penyakit yang ditimbulkan akibat dari stres oksidatif.



Gambar 1. Mekanisme reaksi penangkalan radikal superoksida oleh reagen NBT

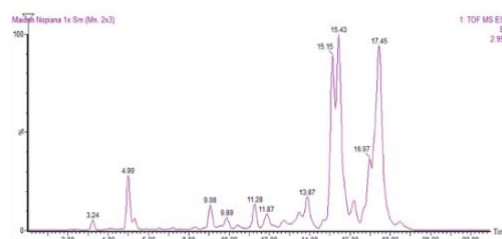
Tabel 2. Aktivitas antioksidan ekstrak daun *S. dulcis*

Ekstrak	Nilai IC_{50} (ppm)
<i>n</i> -heksana	2080
Etil asetat	3500
Metanol	2200

Ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis* menghasilkan nilai antioksidan terbaik dengan IC_{50} sebesar 2080 $\mu\text{g/mL}$ (Tabel 2). Nilai IC_{50} yang dihasilkan tersebut berada pada kategori sangat lemah [13].

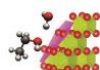
3.3 Karakteristik ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis*

Karakterisasi dilakukan menggunakan LC-MS/MS supaya dapat diketahui senyawa yang terkandung di dalam ekstrak. Fasa terbalik digunakan pada sistem LC-MS/MS. Fasa gerak bersifat lebih polar dibandingkan dengan fasa diamnya. Fasa diam yang digunakan adalah kolom C18 (oktadesil silana) [14]. Pemisahan yang terjadi pada kromatogram cair dikarenakan senyawa-senyawa yang bersifat kurang polar akan tertahan lebih lama pada kolom C18. Tertahannya senyawa-senyawa tersebut karena adanya gaya Van der Waals. Senyawa polar akan terelusi lebih cepat dengan fasa gerak, sehingga terjadi pemisahan [15]. Hal ini menyebabkan pada kromatogram akan terlebih dahulu muncul senyawa yang bersifat lebih polar [16].



Gambar 2. Kromatogram ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis*

Ekstrak *n*-heksana yang dikarakterisasi memunculkan sebanyak 6 senyawa yang terdeteksi pada LC-MS/MS (Tabel 3). Kromatogram yang didapatkan (Gambar 2) memunculkan banyak senyawa, sedangkan hanya sebanyak 6 senyawa yang terdeteksi. Hal ini dapat terjadi akibat koelusi pada proses pemisahan. Koelusi merupakan kejadian dimana 2 atau lebih senyawa tidak terpisah secara kromatografi [17], yang menyebabkan satu puncak kromatografi berisi beberapa molekul senyawa. Berikut adalah

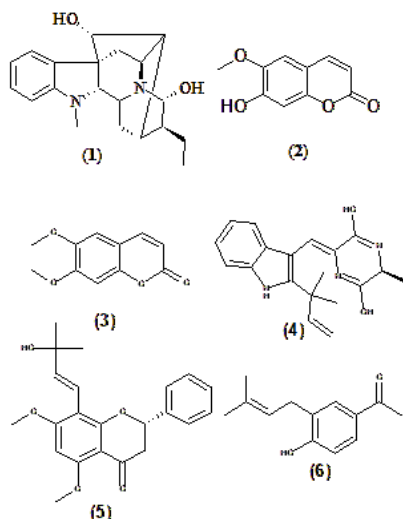


senyawa-senyawa yang diperkirakan ada pada ekstrak (Tabel 3).

Tabel 3. Perkiraan senyawa yang terdapat pada ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis*

Nama Senyawa	Rt (menit)	Fit Conf. (%)
Ajmalin (1)	3,23	90
Skopoletin (2)	5,01	99
Skoparon (3)	7,20	94
3-metil-6-[[2-(2-metilbut-3-en-2-il)-1H-indol-3-il] metiliden] piperazin-2,5-dion (4)	9,60	85
[3-hidroksi-3-metilbut-1-enil]-5,7-dimetoksi-2-fenil-2,3-dihidrochromen-4-on (5)	9,89	84
4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]etanon (6)		

Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis* mengandung sedikit senyawa yang memiliki gugus pendonor H (Gambar 3). Hal ini dikarenakan ekstraksi pelarut *n*-heksana bersifat non-polar sehingga hanya dapat melarutkan senyawa fitokimia yang memiliki kepolaran sama. Gugus H biasanya memiliki peran penting dalam menangkalkan radikal bebas.



Gambar 3. Struktur senyawa yang terkandung pada ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis*

4 Kesimpulan

Nilai aktivitas antioksidan (IC_{50}) ekstrak *n*-heksana daun *S. dulcis* sebesar 2080 $\mu\text{g/mL}$. Berdasarkan analisis LCMS/MS ekstrak *n*-

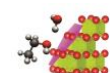
heksana menunjukkan adanya 6 senyawa yang terdeteksi yaitu senyawa ajmalin, skopoletin, skoparon, 3-metil-6-[[2-(2-metilbut-3-en-2-il)-1H-indol-3-il] metiliden] piperazin-2,5-dion, [3-hidroksi-3-metilbut-1-enil]-5,7-dimetoksi-2-fenil-2,3-dihidrochromen-4-on, dan 4-hidroksi-3-(3-metilbut-2-enil)fenil]etanon.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Direktorat DRTPM Kemdikbud RI yang telah mendanai penelitian ini pada skema penelitian dosen pemula dengan nomor kontrak 156/E5/PG.02.00.PT/2022; 100/SP2H/RT-MONO/LL4/2022 and No. 12/PP-Mono/LPPM-UNMA/2020.

Daftar Pustaka

- [1] Halliwell B, Gutteridge JMC. 1991. Free Radicals In Biology And Medicine, Second Edition. *Free Radic Biol Med* [Internet] 10(6):449–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90055-8](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(91)90055-8)
- [2] Hughes DA. 1999. Effects Of Dietary Antioxidants On The Immune Function Of Middle-Aged Adults. *Proc Nutr Soc* [Internet] 58(1):79–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1079/pns19990012>
- [3] Chandra RK. 1992. RETRACTED: Effect Of Vitamin And Trace-Element Supplementation On Immune Responses And Infection In Elderly Subjects. *Lancet* [Internet] 340(8828):1124–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)93151-c](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(92)93151-c)
- [4] da Silva ARA, de Morais SM, Mendes Marques MM, de Oliveira DF, Barros CC, de Almeida RR, et al. 2012. Chemical Composition, Antioxidant And Antibacterial Activities Of Two *Spondias* Species From Northeastern Brazil. *Pharm Biol* [Internet] 50(6):740–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2011.627347>
- [5] Najihah VH, Mugiyanto E, Permadi YW. 2018. Aktivitas Antioksidan, Total Fenol Dan Total Flavonoid Tanaman Kedondong (*Spondias Dulcis* Soland Ex Park). *Farnasaubs* [Internet] 5(2):61–7. Available from: <https://journal.uhamka.ac.id/index.php/far masains/article/view/2375>



- [6] Islam SMA, Ahmed KT, Manik MK, Wahid MA, Kamal CSI. 2013. A Comparative Study Of The Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic And Thrombolytic Potential Of The Fruits And Leaves Of Spondias Dulcis. *Asian Pac J Trop Biomed* [Internet] 3(9):682–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23998007>
- [7] Rachmatiah T, Kimura W, Kusmiati K. 2021. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat Bunga Dan Daun Honje (*Etlingera Elatior* (Jack) R.M. Sm) Pada Darah Domba Terinduksi Tert- Butil Hidroperoksida (T-BHP). *SAINSTECH FARMA* [Internet] 14(2):102–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.37277/sfj.v14i2.1076>
- [8] Rudiana T, Suryani N, Indriatmoko DD, Yusransyah, Amelia A, Noviany, et al. 2019. Characterization Of Antioxidative Fraction Of Plant Stem *Bouea Macrophylla* Griff. *J Phys Conf Ser* [Internet] 1341(7):72008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/1742-6596/1341/7/072008>
- [9] Chairunnisa S, Wartini NM, Suhendra L. 2019. Pengaruh Suhu Dan Waktu Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak Daun Bidara (*Ziziphus Mauritiana* L.) Sebagai Sumber Saponin. *J REKAYASA DAN Manaj AGROINDUSTRI* [Internet] 7(4):551. Available from: <http://dx.doi.org/10.24843/jrma.2019.v07.i04.p07>
- [10] Zhang Q-W, Lin L-G, Ye W-C. 2018. Techniques For Extraction And Isolation Of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chin Med* [Internet] 13:20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29692864>
- [11] Rudiana T, Fitriyanti F, Adawiah A. 2018. Aktivitas Antioksidan Dari Batang *Gandaria* (*Bouea Macrophylla* Griff). *EduChemia (Jurnal Kim dan Pendidikan)* [Internet] 3(2):195. Available from: <http://dx.doi.org/10.30870/educhemia.v3i2.3328>
- [12] Deawati Y, Onggo D, Mulyani I, Rosidah YA, Hastiawan I, Utami RA, et al. 2018. Metode Non-Enzimatis Riboflavin-Nitrobluetetrazolium (Rb-NBT) Sebagai Teknik Penentuan Aktivitas Penangkal Radikal Bebas Anion Superoksida Pada Kompleks Mangan(III)-Salen. *Chim Nat Acta* [Internet] 6(1):12. Available from: <http://dx.doi.org/10.24198/cna.v6.n1.16283>
- [13] Molyneux P. 2004. The Use Of The Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) For Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarinn J Sci Technol* [Internet] 26(2):211–9. Available from: <https://www.thaiscience.info/journals/article/song/10462423.pdf>
- [14] Koltover VK. 2018. Antioxidant Biomedicine: From Chemistry Of Free-Radicals To Reliability Of Biological Systems. *Res Med & Eng Sci* [Internet] 3(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.31031/rmes.2018.03.000565>
- [15] Hermanto S. 2009. Mengenal Lebih Jauh Teknik Analisa Spektroskopi Dan Kromatografi. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah Jakarta;
- [16] Farag MA, Rasheed DM, Kropf M, Heiss AG. 2016. Metabolite Profiling In *Trigonella* Seeds Via UPLC-MS And GC-MS Analyzed Using Multivariate Data Analyses. *Anal Bioanal Chem* [Internet] 408(28):8065–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9910-4>

