

## ISOLASI SENYAWA ANTIOKSIDAN DARI DAUN PILA – PILA (*Mallotus paniculatus*)

Wulan Maulida<sup>1,\*</sup>, Jaka Fadraersada<sup>1</sup>, Laode Rijai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Penelitian dan Pengembangan FARMAKA TROPIS  
Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda, Kalimantan Timur

\*Email: [wulanmaulida95@yahoo.co.id](mailto:wulanmaulida95@yahoo.co.id)

### ABSTRACT

*Pila - Pila (Mallotus paniculatus) is a shrub that is empirically used as antioxidant. Antioxidants are compounds that may delay, prevent or slow the oxidation reaction. Research has been done the isolation of compounds and the antioxidant test of pila-pila leaves. This study aims to find the best eluent by thin layer chromatography and determine the antioxidant activity of these compounds. As many as 10,0 g of pila-pila leaves methanol extract fractionated by solid – liquid method and obtained fraction of ethyl acetate, n-butanol, and methanol. Antioxidant test of the fraction using a radical antioxidant 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 100 ppm. Isolation of etil asetat fraction by column chromatography method using some type of eluent, such N-hexane:ethyl acetate (9:1;8:2;7:3), chloroform:methanol (9:1;8:2;7:3;6:4;5:5), and methanol. From this isolation obtained 9 sub fractions. In sub-fraction of 1 to 9 are crystal with best eluent is N-hexane:ethyl acetate. In subfraction 1, 2, 3, 8, and 9 have antioxidant activity which is characterized by the formation of yellow stain on a TLC plate with a purple background.*

**Keywords:** Antioxidant, DPPH, isolation, pila – pila leaves

### ABSTRAK

Pila – pila (*Mallotus paniculatus*) merupakan tumbuhan semak yang secara empiris digunakan sebagai antioksidan. Antioksidan adalah senyawa yang dapat menunda, mencegah atau memperlambat reaksi oksidasi. Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi senyawa dan uji antioksidan daun pila – pila. Penelitian ini bertujuan untuk mencari eluen terbaik dalam pemisahan senyawa dari daun pila - pila menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan mengetahui aktivitas antioksidan pada senyawa tersebut. Sebanyak 10,0 g ekstrak metanol daun pila – pila difraksinasi dengan metode padat – cair dan didapat fraksi etil asetat, N-butanol, dan metanol. Uji antioksidan pada fraksi dilakukan menggunakan radikal 1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil (DPPH) 100 ppm dan dihasilkan fraksi setil asetat yang terbaik. Kemudian fraksi etil asetat diisolasi dengan metode kromatografi kolom menggunakan beberapa jenis eluen yaitu N-heksan:etil asetat (9:1;8:2;7:3), kloroform:metanol (9:1;8:2;7:3;6:4;5:5) dan metanol. Hasil isolasi diperoleh 9 kelompok sub fraksi. Pada sub fraksi 1 hingga 9 terdapat kristal yang telah diketahui eluen terbaiknya adalah N-heksan : etil asetat. Sub fraksi 1, 2, 3, 8, dan 9 memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning pada plat KLT dengan latar berwarna ungu.

**Kata kunci :** Antioksidan, daun pila - pila,, DPPH, isolasi.

## PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara dengan kekayaan alam yang sangat melimpah. Kekayaan hasil alam Indonesia masih menyimpan banyak manfaat. Penggunaan obat tradisional sebagian besar masih berdasarkan pengalaman empiris secara turun menurun, dan sangat terbatas yang didasarkan hasil penelitian.

Tumbuhan pila-pila (*Mallotus paniculatus* (Lam.) Mull.Arg.,) merupakan salah satu tumbuhan obat Indonesia yang dipercaya oleh masyarakat berkhasiat sebagai obat. *Mallotus paniculatus* merupakan semak dengan tinggi 10 hingga 15 m yang terdiri dari batang, daun, bunga, buah dan biji. Tumbuhan ini dapat ditemukan Cina Selatan, Taiwan, dan India. Selain itu, terdapat juga di Indonesia, terutama di daerah Kalimantan, Sulawesi, dan Sumatera<sup>1</sup>. Daun Pila-pila merupakan bagian dari tumbuhan pila – pila yang mempunyai bau cukup menyengat, berwarna hijau pada bagian depan dan perak pada bagian belakang daun. Saat ini, pila – pila diketahui memiliki aktivitas antioksidan sehingga perlu dilakukan isolasi senyawa antioksidan daun pila – pila untuk mengetahui senyawa aktifnya.

Isolasi merupakan suatu teknik untuk memisahkan suatu senyawa dari senyawa lainnya pada suatu sampel. Isolasi senyawa antioksidan di perlukan karena kegunaan dari antioksidan itu sendiri. Antioksidan merupakan senyawa pemberi elektron (*electron donor*) atau reduktan. Senyawa ini memiliki berat molekul kecil, tetapi mampu menginaktivasi berkembangnya reaksi oksidasi, dengan cara mencegah terbentuknya radikal. Antioksidan juga merupakan senyawa yang dapat menghambat reaksi oksidasi, dengan mengikat radikal bebas dan molekul yang sangat reaktif<sup>2</sup>.

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl*). DPPH merupakan radikal bebas yang menerima satu elektron hidrogen sehingga menjadi molekul yang stabil. Metode uji DPPH merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk memperkirakan efektivitas kinerja substansi yang berperan sebagai antioksidan. Metode pengujian ini berdasarkan kemampuan substansi antioksidan tersebut dalam menetralkan radikal bebas. Radikal bebas yang digunakan adalah 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) yang merupakan radikal bebas sintetik yang stabil pada suhu kamar dan larut dalam pelarut polar. Sifat stabil tersebut dikarenakan radikal bebas ini memiliki satu elektron yang didelokalisasi dari molekul utuhnya sehingga molekul tersebut tidak reaktif sebagaimana radikal bebas lainnya. Metode ini dipilih karena merupakan metode yang sederhana, mudah, cepat, peka, dan hanya memerlukan sedikit bahan<sup>3</sup>.

## METODE PENELITIAN

### Bahan

Bahan yang diteliti adalah tumbuhan pila – pila (*Mallotus paniculatus*), bagian yang diteliti adalah daun. Bahan penelitian : air suling, metanol, n-heksana, etil asetat, kloroform, aseton, pereaksi Dragendroff, asam klorida pekat, serbuk magnesium, besi (III) klorida, asam asetat glasial, asam sulfat pekat. pereaksi DPPH (*1,1- diphenyl-2-picrylhydrazyl*), silica gel, pipa kapiler, dan plat KLT.

### Peralatan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain wadah maserasi, *rotary evaporator* (buchi *rotavapor* R-200), seperangkat alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, seperangkat alat kolom kromatografi, timbangan analitik (Precisa XB 220A), tabung reaksi bertutup, dan mikropipet (*Dragonlab Micropipette Fix & Adjustable*)

## **Prosedur pengambilan dan pengolahan sampel**

Dipilih tumbuhan pila-pila yang segar. Bagian yang diteliti adalah bagian daunnya, kemudian dicuci, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan diangin-anginkan pada udara terbuka didalam ruangan. Setelah sampel kering dilanjutkan dengan pemotongan (perajangan) dan ditimbang simplisia daun Pila-pila. Selanjutnya simplisia dimaserasi dengan metanol, dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diangin-anginkan hingga kering. Ekstrak metanol tersebut kemudian difraksinasi metode Kromatografi Cair Vakum (KCV) menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat.

## **Uji Metabolit Sekunder**

### **a. Uji Alkaloid**

Sebanyak 2 mL ekstrak diuapkan di atas cawan porselin. Residu yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2 M. Larutan yang diperoleh dibagi ke dalam 2 tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai blanko, ditambahkan dengan 3 tetes HCl 2 M. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff. Pada pereaksi Dragendorff akan terbentuk endapan berwarna jingga yang menandakan positif adanya alkaloid<sup>4</sup>.

### **b. Uji Fenol**

Ekstrak sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi untuk dilakukan pengujian fenolik dengan cara ekstrak ditambahkan pereaksi FeCl<sub>3</sub> 1%, jika terjadi warna hitam menunjukkan adanya senyawa Fenolik<sup>4</sup>.

### **c. Uji Flavonoid**

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan dengan air panas secukupnya, kemudian dididihkan selama 5 menit lalu disaring. Filtrat sebanyak 5 mL ditambahkan 0,05 mg serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat, kemudian dikocok kuat-kuat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga<sup>5</sup>.

### **d. Uji Steroid dan Triterpenoid**

Sebanyak 2 mL ekstrak ditambahkan CH<sub>3</sub>COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit. Adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu<sup>5</sup>.

### **e. Uji Saponin**

Sebanyak 2-3 mL ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air panas lalu didinginkan, kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik lalu ditambahkan 1 tetes HCl 2 N. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama tidak kurang dari 10 menit<sup>5</sup>.

### **f. Uji Tanin**

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambahkan dengan beberapa tetes larutan besi(III)klorida 10%. Jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tannin<sup>6</sup>.

## **Isolasi Senyawa**

Diambil 2 gram fraksi dengan aktivitas antioksidan terbaik, dicampurkan dengan silika gel. Dimasukkan kedalam kolom konvensional berisi fase diam silika gel GF254. Dilewatkan eluen dengan metode gradient ke dalam kolom. Eluen yang telah dilewatkan kemudian ditampung di dalam botol vial yang telah ditimbang dan dikalibrasi.

## Uji Antioksidan

Uji antioksidan dilakukan pada subfraksi hasil isolasi dengan menggunakan metode semprot DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*). Subfraksi ditotolkan pada plat KLT kemudian disemprotkan DPPH, subfraksi yang memiliki aktivitas antioksidan ditandai dengan terbentuknya noda berwarna kuning pada plat KLT dengan latar berwarna ungu.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### 1. Skiring Fitokimia

Hasil skrining fitokimia pada daun pila – pila (*Mallotus paniculatus*) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia daun Pila – Pila

Golongan Senyawa	Ekstrak	Fraksi n-hexan	Fraksi etil asetat
Alkaloid	–	–	–
Flavanoid	+	+	+
Saponin	–	–	–
Fenolik	+	+	+
Tanin	+	+	+
Triterpenoid/ steroid	+	+	–

Keterangan : (+) = mengandung golongan senyawa metabolit sekunder  
(–) = tidak mengandung golongan senyawa metabolit sekunder

Berdasarkan hasil skrining fitokimia daun pila – pila yang terdapat pada Tabel 1, menunjukkan bahwa daun pila – pila mengandung flavonoid, fenolik, tanin dan triterpenoid. Hal ini membuktikan bahwa daun pila - pila mengandung senyawa aktif metabolit sekunder. Pada pengujian flavonoid menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna merah tua, untuk uji fenolik dan tannin positif ditunjukkan dengan perubahan warna biru kehitaman. dan untuk uji triterpenoid/steroid hasil positif ditunjukkan dengan adanya cincin merah. Untuk uji alkaloid dan saponin memberikan hasil negatif karena tidak adanya endapan maupun perubahan warna yang terjadi pada saat penambahan pereaksi serta tidak adanya buih yang bertahan setelah pengocokan. Kandungan flavonoid dan tannin yang terkandung didalam daun menunjukkan bahwa, pila - pila berpotensi sebagai antioksidan. Senyawa kimia yang bermanfaat dari tumbuhan adalah hasil dari metabolit sekunder yang berupa alkaloid, steroida/terpenoida, flavonoid atau fenolik. Senyawa ini diantaranya berfungsi sebagai pelindung terhadap serangan atau gangguan yang ada disekitar, sebagai antibiotik dan juga sebagai antioksidan<sup>7</sup>.

### 2. Eluen Senyawa

Hasil eluen terbaik yang dapat memisahkan senyawa dapat dilihat pada table 2.

*Tabel 2. Eluen Terbaik Senyawa*

Subfraksi	Eluen	Perbandingan
1	N-heksan : etil asetat	40 : 1
2	N-heksan : etil asetat	40 : 1
3	N-heksan : etil asetat	20 : 1
4	N-heksan : etil asetat	20 : 1
5	N-heksan : etil asetat	15 : 1
6	N-heksan : etil asetat	15 : 1
7	N-heksan : etil asetat	10 : 1
8	N-heksan : etil asetat	9 : 1
9	N-heksan : etil asetat	9 : 1

Eluen merupakan pelarut yang digunakan sebagai fase gerak yang membawa dan memisahkan komponen – komponen zat sampel melalui fase diam dalam proses elusi. Eluen terdiri dari beberapa jenis pelarut dengan perbandingan tertentu yang dapat memisahkan suatu komponen senyawa. Eluen terbaik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa tersebut dengan baik. Sifat kepolaran dari pelarut pada eluen yang digunakan mencerminkan sifat kepolaran senyawa tersebut. Pada hasil penelitian ini, didapatkan bahwa subfraksi 1 – 9 memiliki sifat yang sangat non-polar karena menggunakan pelarut n – heksan (non-polar) dengan perbandingan yang lebih banyak dibandingkan etil asetat (semipolar). Senyawa pada subfraksi nomor 1 dan 2 merupakan senyawa yang paling non-polar. Perbedaan eluen pada setiap subfraksi menandakan bahwa senyawa yang terdapat pada setiap subfraksi tersebut adalah berbeda – beda.

### 3. Uji Aktivitas Antioksidan

Hasil uji aktivitas antioksidan pada subfraksi daun pila – pila hasil isolasi dapat dilihat pada tabel 3.

*Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Daun Pila – Pila*

SubFraksi	Aktivitas Antioksidan	Keterangan
1	+	Terbentuk warna kuning
2	+	Terbentuk warna kuning
3	+	Terbentuk warna kuning
4	–	Tidak terbentuk warna kuning
5	–	Tidak terbentuk warna kuning
6	–	Tidak terbentuk warna kuning
7	–	Tidak terbentuk warna kuning
8	+	Terbentuk warna kuning
9	+	Terbentuk warna kuning

Keterangan : (+) = mengandung senyawa antioksidan

(–) = tidak mengandung senyawa antioksidan

Suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas antioksidan apabila senyawa tersebut mampu mendonorkan atom hidrogennya pada radikal bebas DPPH. Hal ini ditandai dengan terjadinya perubahan warna ungu menjadi kuning pucat (Sudirman, 2013). Perubahan warna

ungu menjadi kuning pucat tersebut terjadi pada subfraksi nomor 1, 2, 3, 8, dan 9 yang telah ditotolkan pada plat KLT dan disemprotkan DPPH.

Aktivitas antioksidan dari suatu senyawa dikarenakan karena jenis metabolit sekunder senyawa tersebut. Hasil uji golongan metabolit sekunder pada subfraksi 1 – 9 dengan menggunakan pereaksi semprot dapat dilihat pada table 4.

*Tabel 4. Hasil Uji Golongan Metabolit Sekunder pada Subfraksi*

Subfraksi	1	2	3	8	9
KOH	-	-	-	-	-
FeCl <sub>3</sub>	-	-	-	+	-
Sitroborat	+	+	+	-	-
Liebermann-Buchard	+	+	-	-	+

Keterangan : (+) = terjadi perubahan warna

(-) = tidak terjadi perubahan warna

Senyawa naftokuinon dan senyawa kumarin dideteksi dengan pereaksi semprot KOH 10% dalam etanol. Pengamatan secara visual yang menunjukkan warna kuning, orange, dan coklat – violet adalah senyawa derivat naftokuinon. Sedangkan jika pengamatan secara visual berwarna merah adalah antrakinin. Pengamatan pada UV<sub>366nm</sub> berfluoresensi biru adalah senyawa kumarin. Senyawa fenol dideteksi dengan pereaksi semprot FeCl<sub>3</sub> dan secara visual menunjukkan warna hijau, merah, ungu, biru, atau hitam yang kuat. Senyawa flavonoid dideteksi dengan pereaksi semprot sitroborat. Pengamatan dilakukan setelah plat yang sudah disemprot dipanaskan selama 5 – 10 menit pada suhu 100°C berfluoresensi hijau – kuning pada UV<sub>366nm</sub>. Pereaksi Liebermann – Buchard digunakan untuk mengidentifikasi senyawa triterpenoid, steroid, dan sterol jenuh / triterpen. Pengamatan dilakukan setelah plat KLT yang sudah disemprot dipanaskan selama 5 – 10 menit pada suhu 100°C. Pengamatan yang dilakukan secara visual senyawa triterpenoid akan menunjukkan warna merah, merah muda atau ungu. Senyawa steroid akan berwarna biru atau biru – hijau. Sedangkan senyawa sterol jenuh / triterpen jenuh akan berwarna kuning pucat<sup>8</sup>. Berdasarkan uji KLT dan identifikasi dengan beberapa pereaksi semprot maka dapat diketahui subfraksi 1 dan 2 mengandung golongan senyawa flavonoid yang ditandai dengan fluoresensi hijau dan triterpenoid yang ditandai dengan warna merah keunguan. Subfraksi 3 mengandung flavonoid, subfraksi 8 mengandung fenol yang ditandai dengan adanya warna merah, sedangkan subfraksi 9 mengandung senyawa steroid karena adanya warna biru.

Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antioksidan bisa secara langsung maupun secara tidak langsung. Flavonoid sebagai antioksidan secara langsung yaitu dengan mendonorkan ion hidrogen sehingga dapat menetralkan efek toksik dari radikal bebas. Sedangkan flavonoid secara tidak langsung adalah dengan meningkatkan sensitifitas antioksidan endogen<sup>9</sup>. Berdasarkan mekanisme kerja tersebut maka dapat dikatakan bahwa flavonoid bekerja dengan mekanisme kerja antioksidan sekunder.

Senyawa fenol memiliki mekanisme penangkapan radikal bebas melalui reaksinya dengan gugus –OH<sup>10</sup>. Berdasarkan mekanisme kerja tersebut maka dapat dikatakan bahwa senyawa fenol bekerja dengan mekanisme kerja antioksidan sekunder.

Triterpenoid/steroid bekerja sebagai antioksidan dengan mekanisme kerja antioksidan primer yaitu mampu mengurangi pembentukan radikal bebas baru dengan cara memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Hasil skrining fitokimia, daun pila – pila mengandung flavonoid, tannin, fenol, dan triterpenoid
2. Eluen terbaik pada subfraksi 1 – 9 adalah n-heksan : etil asetat dengan perbandingan 40 : 1 pada subfraksi 1 dan 2, 20 : 1 pada subfraksi 3 dan 4, 15 : 1 pada subfraksi 5 dan 6, 10 : 1 pada subfraksi 7, dan 9 : 1 pada subfraksi 8 dan 9.
3. Subfraksi 1, 2, 3, 8, dan 9 daun pila – pila hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang ditandai dengan perubahan warna ungu menjadi kuning.
4. Subfraksi 1 dan 2 mengandung flavonoid dan triterpenoid, subfraksi 3 mengandung flavonoid, subfraksi 8 mengandung fenol, dan subfraksi 9 mengandung steroid.

### Saran

Sebaiknya dilakukan pemurnian dari subfraksi daun pila – pila yang telah diketahui aktivitas antioksidannya sehingga didapatkan senyawa tunggal.

## DAFTAR PUSTAKA

1. JFW, Slik. 2009. *Asianplant.Net: Plants of Southeast Asia*. Diunduh tanggal 15 April 2016.
2. Winarsi, H. 2007. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas* Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
3. Sudirman, Sadir. 2013. Isolasi Senyawa Antioksidan sebagai Penangkal Radikal Bebas dari Buah Lindur (*Bruguiera gymnorhiza*). Institut Teknologi Bandung.
4. Farnsworth, N. R. 1966. Biological and Phytochemical Screening of Plant. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55: 59.
5. Harborne, J.B., 1996. *Metode Fitokimia*. Terjemahan: Padmawinata, K dan Soediro, I. Institut Teknologi Bandung: Bandung.
6. Jones, W.P., Kinghorn, A.D., 2006. *Extraction of Plant Secondary Metabolites*. In: *Sharker, S.D. Latif Z., Gray A.L, eds. Natural Product Isolation*. 2nd edition. Humana Press: New Jersey.
7. Atmoko, T. dan A. Ma'ruf. 2009. Uji Toksisitas dan Skrining Fitokimia Ekstrak Tumbuhan Sumber Pakan Orangutan Terhadap Larva *Artemia Salina* L. *Jurnal Penelitian dan Konservasi Alam*. 6(1): 37-45.
8. Novia dan Ratna. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.) dan Bioautografi terhadap *Bacillus subtilis* dan *Shigella sonnei*.
9. Kusuma, A. S. W. *The Effect of Ethanol Extract of Soursop Leaves (Annona muricata L.) to Decreased Levels of Malondialdehyde*.
10. Kusumawati, DH. dan Widya, DRP. 2013. Karakteristik Fisik dan Kimia *Edible Film* Pati Jagung yang Diinkorporasi dengan Perasan Temu Hitam. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 1(1): 90-100.