



**Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Daun Melinjo (*Gnetum Gnenom L.*)  
Menggunakan Metode CUPRAC (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*)**

***Antioxidant Activity of Fraction From Gnetum Gnenom L. Leaves Using Cuprac (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Methods***

Windi Susmayanti<sup>(1)</sup>, Azmi Rahmadani<sup>(2)</sup>

<sup>(1)(2)</sup>Farmasi, Universitas Islam Sultan Agung Semarang

Email Korespondensi: windisusmayanti@unissula.ac.id

**ABSTRAK**

Molekul radikal bebas bersifat reaktif dan tidak stabil yang disebabkan elektronnya tidak berpasangan terbentuk dari hasil metabolisme tubuh karena pola hidup tidak sehat. Radikal bebas dapat diatasi dengan antioksidan sintesis maupun alami, namun antioksidan sintesis memiliki dampak buruk jika dipakai secara terus menerus, maka dikembangkan antioksidan alami dari daun melinjo (*Gnetum gnenom L.*). Penelitian ini bertujuan mengetahui potensi antioksidan alami yang akan dikembangkan sebagai kandidat obat. Metode yang digunakan meliputi metode maserasi dalam pembuatan ekstrak etanol 96% dan metode fraksinasi dalam pembuatan fraksi menggunakan air, n-heksana, etil asetat. Ekstrak etanol 96% dan fraksi daun melinjo diujikan skiring fitokimia dan aktivitas antioksidan dengan metode Cuprac (*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*). Hasil menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% dan fraksi-fraksi daun melinjo mengandung senyawa polifenol/fenolik, alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, dan tannin. Uji aktivitas antioksidan menunjukkan IC<sub>50</sub> ekstrak etanol 96% sebesar 60,689 ppm, IC<sub>50</sub> fraksi etil asetat sebesar 59,7951 ppm, nilai IC<sub>50</sub> fraksi air sebesar 67,915 ppm menunjukkan antioksidan kuat karena senyawa fenol atau gugus -OH yang terikat. IC<sub>50</sub> Fraksi n-heksana sebesar 117,235 ppm menunjukkan antioksidan sedang karena diduga mengandung senyawa yang memiliki rantai karbon panjang dan belum murni yang mempengaruhi aktivitas antioksidan.

**Kata kunci :** *Antioksidan, Gnetum gnenom L, Fraksinasi, Maserasi, Cuprac*

**ABSTRACT**

*Free radicals are highly reactive and unstable molecules because have unpaired electrons, which was formed from the results of the body's metabolism caused by an unhealthy lifestyle. Free radicals can be overcome by synthetic or natural antioxidants, but synthetic antioxidants have a bad impact if used continuously, so natural antioxidants are developed from melinjo leaves (*Gnetum gnenom L.*). The research purpose is to determine the potential of natural antioxidants that could be developed as drug candidates. Methods used include preparation of 96% ethanol extract by maceration and using water, n-hexane and ethyl acetate by fractionation. Ethanol 96% extract and melinjo leaf fractions were tested for phytochemical screening and antioxidant activity using the CUPRAC (*Cupric Reducing Antioxidant Capacity*) method. The results showed that ethanol 96% extracts and melinjo leaf fractions contained flavonoids, polyphenols/phenolic, alkaloids, steroids, terpenoids, and tannins. The antioxidant activity test showed the IC<sub>50</sub> of the 96% ethanol extract was 60.689 ppm, the IC<sub>50</sub> of the ethyl acetate fraction was 59.7951 ppm, the IC<sub>50</sub> value of the water fraction was 67.915 ppm indicating a strong antioxidant due to the phenol compound or -OH group attached. IC<sub>50</sub> The n-hexane fraction of 117.235 ppm showed moderate antioxidant because it was suspected to contain compounds that have long carbon chains that affect antioxidant activity*

**Keywords:** Antioxidant, *Gnetum genom L.*, Fractination, Maceration, CUPRAC

## PENDAHULUAN

Molekul radikal bebas memiliki elektron yang tidak berpasangan dan bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Secara umumnya, radikal bebas yang dihasilkan didalam tubuh melalui hasil metabolisme tubuh yang dipengaruhi adanya faktor luar antara lain terpapar sinar ultraviolet, bahan pengawet dalam makanan, asap rokok dan polutan lainnya yang menyebabkan terjadi stress oksidatif dimana ketidakseimbangan antara jumlah radikal bebas dengan antioksidan di dalam tubuh (Werdhari, 2014). Stress oksidatif dapat diatasi dengan distabilkan dan dinetralkan oleh senyawa antioksidan sehingga mengurangi resiko penyakit dan kerusakan sel tubuh (Maharani *et al.*, 2021). Jenis antioksidan yang terbentuk dalam tubuh yaitu antioksidan endogen yang berasal dari tubuh sendiri, dan antioksidan eksogen merupakan antioksidan yang diperlukan dari luar tubuh dimana antioksidan endogen tidak mampu mencegah radikal bebas yang berlebihan. Secara umum, antioksidan eksogen merupakan antioksidan sintetik yang memiliki efek berbahaya bagi tubuh antara lain *Butylated Hydroxy Toluene* (BHT) karena dapat bersifat karsinogenik. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif antioksidan alami dalam mengatasi stress oksidatif. Antioksidan alami seringkali berasal dari tanaman (Hani & Milanda, 2021). Salah satu tanaman yang dikenal memiliki antioksidan alami adalah Melinjo. Melinjo atau *Gnetum gnemon L.* termasuk dalam famili dari *Gnetaceae* yang penyebarannya Asia Tenggara kebanyakan terdapat pada wilayah Indonesia yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Secara tradisional, tanaman melinjo berkhasiat sebagai pencegahan penuaan dini, meningkatkan daya tahan tubuh lemah, sebagai obat herbal penyakit kardiovaskuler dan kanker (Utama *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian sebelumnya,

tanaman melinjo juga dapat mengatasi penyakit degeneratif seperti antihiperlipidemia, diabetes dan sebagainya (Achmad Ali Fikri, Syamsul Arifin, 2022). Hal ini berkaitan dengan aktivitas antioksidan tinggi untuk mengurangi radikal bebas. Tingginya aktivitas antioksidan pada suatu tanaman dipengaruhi oleh senyawa metabolit sekunder yang dikandungnya (Septiani *et al.*, 2011).

Pengujian secara kualitatif terhadap ekstrak daun melinjo menunjukkan bahwa mengandung metabolit sekunder adanya golongan alkaloid, flavonoid, steroid, saponin dan tanin (Bharali *et al.*, 2018). Analisis kuantitatif menunjukkan bahwa ekstrak daun melinjo mengandung metabolit sekunder dalam jumlah besar. Kadar tannin tertinggi dilaporkan (7,32-8,40%), saponin (5,32-7,49%), flavonoid (0,96%) yang menunjukkan bahwa daun melinjo sangat aktif dan diduga aktivitas antioksidan yang tinggi sehingga dapat melawan berbagai macam penyakit (Bharali *et al.*, 2018). Hal ini dibuktikan dengan penelitian sebelumnya dengan menguji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) terhadap ekstrak etanol daun melinjo secara *in vitro* menghasilkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 38,83  $\mu\text{g/mL}$  menunjukkan aktivitas antioksidan kuat (Rahmiyani *et al.*, 2010). Hal ini berkaitan adanya aktivitas senyawa flavonoid yang dapat mendonorkan satu atom hidrogen untuk menstabilkan radikal bebas. Menurut Pudjiatmoko (2007), aktivitas antioksidan senyawa fenolik/flavonoid melinjo setara dengan antioksidan sintetik BHT (*Butylated Hydroxy Toluene*). Senyawa flavonoid yang berpotensi sebagai antioksidan yaitu golongan antosianin (Utama *et al.*, 2019). Senyawa flavonoid atau fenolik dapat diambil dengan proses fraksinasi dengan membentuk beberapa

fraksi sesuai dengan kepolaran pelarut. Hal ini karena flavonoid merupakan golongan fenolik alam terbesar yang bersifat polar karena terdapat sejumlah gugus hidroksil atau gula pada struktur dasarnya (Lamk *et al.*, 2012). Aktivitas antioksidan ini dapat diperoleh pada fraksinasi bertingkat berdasarkan kepolaran pelarut. Hal ini untuk mengetahui fraksi yang teraktif yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian Rahmiyanni (2010) menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan secara DPPH pada fraksi etil asetat kulit melinjo berpotensi tinggi. Hal ini sebagai acuan bahwa fraksi daun melinjo yang menggunakan pelarut berdasarkan kepolaran akan berindikasi menghasilkan aktivitas antioksidan lebih baik.

Berdasarkan latar belakang diatas, penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% dan fraksi daun melinjo dengan metode Cuprac (*Cupric ion Reducing Antioxidant capacity*) yang belum pernah dilaporkan. Pereaksi CUPRAC ini memiliki nilai potensial reduksi yang rendah dan selektif dibanding metode yang lain. Metode ini lebih akurat dibanding metode DPPH untuk melihat aktivitas antioksidan khususnya golongan fenolik (Apack *Et al.*, 2010).

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

#### Alat

Penelitian ini menggunakan alat alat antara lain Spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu), kuvet disposable, corong Buchner, timbangan analitik, ayakan 100 mesh, waterbath, toples maserasi, alat-alat gelas, alumunium foil, spatula, vial, magenetik stirer, blender, kertas saring, cawan, corong pisah.

Bahan bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah Daun Melinjo yang masih muda diambil dari daerah Welahan Jepara, Aquadest, Buffer Amonium asetat (Merck),  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (merck), etanol 96% teknis, n-heksana teknis, dan etil asetat

teknis, reagen dragendrof,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{NaCl}$ .

### Determinasi Daun melinjo

Daun Melinjo (*Gnetum gnemon L.*) diambil dari Kabupaten Jepara, selanjutnya bahan tersebut dilakukan determinasi di Prodi Biologi Fakultas Sains Universitas Diponegoro Semarang.

### Pembuatan Simplisia

Bahan daun melinjo segar disortasi basah, pencucian, pengeringan dengan diangin-anginkan dan dipanaskan pada oven suhu  $50^\circ\text{C}$  kurang lebih 3 jam dan dihaluskan dengan blender hingga diperoleh serbuk simplisia, kemudian dilakukan pengayakan ukuran 100 mesh.

### Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan sebanyak 100 gr Serbuk simplisia kering daun melinjo dicampur dengan 500 mL Etanol 96% ditempatkan di toples maserasi, ditutup serta didiamkan selama 1 x 24 jam. Setiap 24 jam larutan akan disaring dengan kertas penyaring dan filtrate diuapkan menggunakan *rotary evaporator* mendapatkan ekstrak cair kemudian di *waterbath* pada suhu  $40^\circ\text{C}$  selama 12 jam. Residu hasil penyaringan diremaserasi, penyaringan dan evaporasi selama 3 kali. Ekstrak yang diperoleh harus memiliki kadar air kurang dari 10%.

### Fraksinasi

Ekstrak kental etanol dilakukan proses fraksinasi bertingkat dengan menggunakan corong pisah, 20 g ekstrak disuspensikan dengan aquades 20 mL dilakukan fraksinasi pertama dengan n-heksan. Campuran diaduk menggunakan magnetik stirrer selama 15 menit dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan, kemudian dipisahkan melalui corong pisah dan diambil lapisan atas sebagai fraksi n-heksana lalu refraksinasi dilakukan dua kali sama banyak. Fraksi bawah yang tidak larut n-heksan difraksinasi kembali dengan etil asetat sama banyak (1:1) digojok sehingga terbentuk 2 lapisan dan diambil lapisan atas (fraksi etil asetat). Fraksi larut etil asetat dikumpulkan dan diuapkan pelarut etil

asetat menjadi fraksi etil asetat. Fraksi yang tidak larut etil asetat (lapisan bawah) kemudian direfraksinasi dua kali sama banyak. Fraksi tidak larut etil asetat dikumpulkan dan diuapkan untuk menjadi fraksi air.

### **Skrining Fitokimia (Uji Kualitatif)**

Skrining fitokimia dilakukan pada ekstrak dan fraksi-fraksi pada daun melinjo. Skrining fitokimia sebagai mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder ekstrak daun melinjo seperti; alkaloid, steroid, flavonoid, polifenol/fenolik, tanin, saponin, triterpenoid dan hidroquinon (Isnaini *et al.*, 2021). Skrining fitokimia secara kualitatif dengan menggunakan uji warna. Langkah-langkah Skrining fitokimia sebagai berikut :

### **Larutan uji skrining fitokimia**

Pembuatan larutan uji dengan membuat 50 mg ekstrak/fraksi dilarutkan 25 mL pelarut etanol 96%. Larutan uji tersebut dapat digunakan dalam pengujian alkaloid, flavonoid, fenol, tannin, saponin.

### **Uji Alkaloid**

Uji Dragendroff: sebanyak 2 ml reagen Dragendroff (kalium bismut iodida) direaksikan dengan 2 ml larutan uji akan menunjukkan positif alkaloid jika terbentuk endapan merah.

### **Uji Steroid**

Uji Libermann-Burchard: 0,25 g ekstrak/fraksi dimasukkan  $\text{CHCl}_3$  dan diaduk lalu penyaringan, filtrate ditambah asam asetat anhidrat lalu dipanaskan serta didinginkan, kemudian ditambah  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat di pinggir tabung secara bertahap akan menunjukkan lingkaran cincin warna coklat apabila positif steroid.

### **Uji Flavonoid**

Larutan uji sebanyak 2 ml diteteskan beberapa larutan NaOH terbentuk warna kuning. Kemudian ditambah campuran asam encer apabila warna kuning memudar jika Uji menunjukkan positif flavonoid .

### **Uji Fenol**

Larutan uji sebanyak 2 ml ditambahkan 2 mL  $\text{FeCl}_3$  3% akan

terbentuk endapan hijau/coklat kehitaman menunjukkan hasil positif fenol,

### **Uji Tanin**

Larutan uji 2 ml ditambahkan 2 ml larutan gelatin 1% mengandung NaCl akan menunjukkan tanin positif jika terbentuk endapan putih,

### **Uji Saponin**

Larutan uji sebanyak 2 ml dicampurkan 2 ml air kemudian dikocok akan menimbulkan busa yang bertahan 10 menit akan menunjukkan hasil positif saponin.

### **Uji Triterpenoid**

Salkowski's Test: 0,25 g ekstrak/fraksi dimasukkan  $\text{CHCl}_3$  dan diaduk lalu penyaringan, filtrate akan ditambahkan beberapa tetes  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dikocok akan berubah menjadi warna kuning emas jika menunjukkan hasil positif triterpen.

### **Uji Hidroquinon**

Ekstrak/fraksi sebanyak 0,5 g dilarutkan pada air panas dan dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit lalu disaring diambil filtratnya ditambahkan NaOH sebanyak 3 tetes akan menghasilkan endapan berwarna merah jika kuinon positif.

### **Uji Aktivitas Antioksidan**

Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada ekstrak etanol dan fraksi daun melinjo melalui metode CUPRAC.

### **Pembuatan Reagen Cuprac dan Penentuan Panjang Gelombang Maksimum ( $\lambda$ Maks)**

Pembuatan reagen *Cuprac* dilakukan dengan mencampurkan 5 ml  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,01 M ; 5 ml *Neocupproine Etanolik* 0,0075 M ; 5 ml Buffer  $\text{NH}_4\text{Ac}$  1 M, dan 1 mL aquadest. Reagen *cuprac* dilakukan pengadukan kemudian diukur untuk menentukan panjang gelombang maksimum pada 400-600 nm dengan 1 ml etanol p.a dalam vial dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Haeria *et al.*, 2018).

**Pengukuran Absorbansi Aktivitas Larutan Perbandingan**

Larutan perbandingan atau kontrol positif menggunakan kuersitien dengan pembuatan konsentrasi 1000 ppm larutan induk. Larutan induk digunakan membuat seri konsentrasi (5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 75 ppm). Larutan seri konsentrasi kuersitien sebanyak 1 ml larutan seri yang ditambahkan reagen cuprac diinkubasi selama 30 menit (Haeria et al., 2018). Absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dari larutan cuprac.

**Pengukuran Absorbansi Aktivitas Antioksidan Sampel**

Pembuatan larutan induk konsentrasi 1000 ppm Sampel ekstrak etanol 96%, dan fraksi daun melinjo kemudian dibuat seri konsentrasi yang sama yaitu 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm dan 75 ppm dan dilakukan pengujian mengukur absorbansi. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan seri konsentrasi ekstrak maupun fraksi daun melinjo sebanyak 1 ml dimasukkan dalam vial ditambahkan 1 ml reagen cuprac. Larutan seri konsentrasi masing masing sampel dan reagen cuprac diinkubasi selama 30 menit lalu dilakukan pengukuran absorbansi (Haeria et al., 2018).

**Analisis Data**

Dari hasil pengukuran absorbansi dapat dihasilkan aktivitas antioksidan dapat dinyatakan *Inhibition Concentration* (IC<sub>50</sub>) sebagai hubungan konsentrasi sampel (x) dengan aktivitas antioksidan sebagai penangkapan radikal bebas berupa % inhibisi (y) dari persamaan regresi linier. hubungan tersebut dapat dinyatakan persamaan garis  $y = bx + a$  yang memperlihatkan nilai IC<sub>50</sub> sebagai nilai x dan mengganti  $y = 50$  seperti rumus berikut:

$$50 = b (IC_{50}) + a \dots\dots\dots (1)$$

Keterangan : b = koefisien regresi/slope  
a = intersep

Aktivitas antioksidan dinyatakan oleh besarnya nilai IC<sub>50</sub> yang dihasilkan dari persamaan regresi. aktivitas antioksidan semakin kuat karena nilai IC<sub>50</sub> semakin kecil. Aktivitas antioksidan sangat kuat nilai IC<sub>50</sub> < 50, antioksidan kuat nilai IC<sub>50</sub> 50-100, antioksidan sedang nilai IC<sub>50</sub> 100-250, dan antioksidan lemah nilai IC<sub>50</sub> 250-500. maka (Candra et al, 2017).

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil**

**Rendemen Ekstrak Etanol**

Pengeringan simplisia dari bahan basah daun melinjo sebanyak 3000 gram menghasilkan simplisia kering sebanyak 578 gram kemudian dilakukan penyerbukan. Simplisia daun melinjo diblender menjadi bubuk berkurang menjadi 532 gram. Serbuk simplisia kering diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dan dilakukan remaserasi sebanyak 3x sehingga menghasilkan rendemen ekstrak etanol 96% seperti yang terdapat pada tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak etanol daun melinjo

Bobot Awal Daun Melinjo Kering (gram)	Bobot Ekstrak Etanol 96% (gram)	Rendemen (%)
578	84,235	14,57

**Fraksinasi Ekstrak**

Ekstrak Etanol 96% daun melinjo dilakukan Fraksinasi dengan pelarut n-heksana, Etil Asetat dan Aquadest menghasilkan rendemen seperti yang terdapat pada tabel 2.

Tabel 2. Rendemen Fraksi daun melinjo

Bobot ekstrak Etanol (gram)	Fraksi	Bobot Fraksi (gram)	Rendemen (%)
40	n-Heksana	5,712	14,28
	Etil Asetat	10,362	25,905
	Air	14,879	37,195

## Skrining Fitokimia

Pengujian Kandungan Kimia dilakukan pada ekstrak etanol 96% dan fraksi-fraksi daun melinjo terdapat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Skring Fitokimia

Metabolit Skunder	Ekstrak Etanol 96%	Fraksi n-heksana	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Air
Flavonoid	+	+	+	+
Polifenol	+	+	+	+
Alkaloid	+	+	+	+
Steroid	+	+	+	+
Triterpenoid	+	+	+	+
Tanin	+	+	+	+
Saponin	-	-	-	-
Hidroquinon	-	-	-	-

## Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan metode Cuprac

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode *Cuprac* sampel sampel dari ekstrak etanol dan fraksi etil asetat, fraksi n-heksana, fraksi air dengan berbagai konsentrasi yang dibandingkan sampel baku kuersetin (kontrol positif antioksidan). Hasil Uji aktivitas antioksidan terdapat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil Perbandingan Uji Aktivitas Antioksidan metode CUPRAC

Sampel	Konsentrasi (ppm)	Rerata % inhibisi	IC <sub>50</sub> (ppm)
Kuersetin	5	8,897	5,582
	10	17,058	
	25	29,089	
	50	38,177	
	75	42,567	
Ekstrak Etanol 96%	5	22,245	60,689
	10	24,376	
	25	31,456	
	50	45,893	
	75	56,564	
Ekstrak n-Heksana	5	11,813	117,235
	10	13,452	
	25	16,564	
	50	27,687	
	75	35,344	
Ekstrak Etil Asetat	5	23,657	59,7951
	10	25,453	
	25	32,675	
	50	41,854	
	75	59,657	
Ekstrak Air	5	11,822	67,915
	10	14,852	
	25	29,102	
	50	42,465	
	75	51,346	

## Pembahasan

## Hasil Determinasi

Identifikasi tumbuhan dilakukan determinasi daun melinjo menunjukkan spesies *Gnetum gnemon* L. termasuk famili dari *Gnetaceae*.

## Proses Ekstraksi

Pada preparasi sampel segar daun melinjo disortasi basah bertujuan untuk memisahkan pengotor atau benda asing lainnya pada sampel yang akan digunakan. Pencucian sampel menggunakan air mengalir bertujuan untuk pengotor-pengotor yang masih ada dapat terangkat oleh air, selanjutnya pengeringan dengan cara menganginkan beberapa hari dan dipanaskan alam oven dengan suhu 50°C untuk menghilangkan kadar air daun melinjo sehingga mendapatkan berat konstan dan simplisia kering agar sampel tidak ditumbuhi oleh jamur. Simplisia kering disortasi kering kembali agar benda asing dan pengotor yang tidak diinginkan masih tertinggal selama pengeringan dapat dipisahkan (Tanamal *et al.*, 2017).

Sampel daun melinjo kering dihaluskan dengan blender diperoleh serbuk simplisia dan dilakukan pengayakan ukuran 100 mesh untuk ukuran partikel serbuk yang kecil dengan tujuan memperluas permukaan sampel agar lebih besar kontak sampel dengan pelarut sehingga senyawa yang terkandung serbuk simplisia lebih mudah tersari oleh pelarut yang digunakan pada maserasi dan mempermudah pelepasan zat aktif selama ekstraksi.

Metode maserasi dipilih dalam proses ekstraksi karena metode ini tergolong metode ini sederhana, tidak memerlukan banyak bahan dan prosenya cepat tetapi sudah bisa mengambil/mengikat senyawa aktif secara maksimal dari simplisia serbuk (Sa'adah, 2015) dan menggunakan pemanasan dalam suhu rendah <50°C yang bertujuan mencegah tidak stabil terhadap panas sehingga terjadi kerusakan senyawa yang seperti saponin (Daud, 2011). Pelarut ekstraksi yang digunakan yaitu pelarut

etanol 96% disesuaikan dengan kepolaran senyawa dan bersifat universal karena dapat mengikat senyawa polar sampai non polar. Etanol bersifat tidak beracun yang aman dan mudah diperoleh. Setelah proses ekstraksi dilakukan penyaringan untuk memisahkan residu dan filtrat. Residu diremaserasi kembali sedangkan filtrat sebagai maserat untuk dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*. Proses pemekatan tersebut menghasilkan ekstrak kental etanol berwarna hijau kecoklatan sebanyak 84,235 gram dengan rendemen 14,57 %. Ekstrak kental etanol 96% daun melinjo diletakkan pada desikator untuk menjaga kelembapan dan mengurangi kadar air 8,94% dimana syarat kadar air < 10% untuk mencegah pertumbuhan mikroba yang memungkinkan dapat menguraikan kandungan bahan organik.

#### Fraksinasi

Ekstrak dilakukan proses fraksinasi untuk menyederhanakan komponen-komponen metabolit yang terdapat pada ekstrak. Fraksinasi dilakukan berdasarkan derajat kepolaran pelarutnya menggunakan tiga jenis pelarut yang berbeda dan berat jenis yang berbeda. Metode ekstraksi cair-cair dipilih dalam proses fraksinasi berdasarkan prinsip menarik senyawa pada ekstrak menggunakan dua pelarut yang tidak bercampur (Sari, 2012).

Fraksinasi dimulai dari mensuspensikan ekstrak etanol daun melinjo dengan aquadest bertujuan untuk melarutkan senyawa yang lebih polar daripada ekstrak etanol. Fraksinasi pelarut n-heksana untuk mengikat dan mengambil senyawa-senyawa non polar. selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat yang bersifat semi polar untuk mengikat dan mengambil senyawa-senyawa semi polar yang terkandung dalam ekstrak.

#### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan terhadap daun segar, ekstrak dan fraksi agar diketahui gambaran secara kualitatif dengan uji perubahan warna untuk melihat kandungan golongan senyawa metabolit

sekunder sampel. Hasil skrining fitokimia pada sampel segar dan ekstrak etanol serta fraksi-fraksi air, etil asetat dan n-heksana daun melinjo menunjukkan adanya senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid kecuali tannin dan saponin.

#### Uji Aktivitas

Metode *cuprac* dipilih dalam pengujian aktivitas penangkapan radikal bebas berdasarkan prinsip kemampuan sampel antioksidan yang mereduksi  $\text{Cu}^{2+}$  menjadi kompleks  $\text{Cu}^+$  dengan ditandai perubahan warna biru menjadi kuning pada bercak senyawa. Pemilihan Cuprac untuk pengujian antioksidan disebabkan bahwa metode ini sederhana untuk penentuan aktivitas antioksidan dari sampel tanaman untuk mengolah berbagai matriks sampel yang terdapat dalam tanaman (Hafiz *et al.*, 2020). Metode ini juga memiliki kelebihan dibandingkan metode lainnya karena cukup cepat untuk mengoksidasi tiol yang merupakan salah satu golongan antioksidan. Reagen Cuprac dapat diakses reagen kromogenik lainnya dan lebih stabil serta dapat mengukur baik senyawa yang bersifat polar dan nonpolar dari antioksidan (Maryam, 2015)

Pengukuran Absorbansi pada konsentrasi ekstrak dan fraksi daun melinjo dan sampel pembanding kuersetin dengan panjang gelombang 424 nm menggunakan spektrometer UV Vis. Absorbansi yang dihasilkan berkaitan nilai  $\text{IC}_{50}$  dari kurva baku persamaan linier  $y=bx+a$  dimana konsentrasi digunakan untuk mencari % inhibisi. Pada penelitian hasil pengukuran sampel pembanding Kuersetin diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar 5,582 ppm termasuk kategori sangat kuat, Sedangkan sampel ekstrak etanol diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar 60,689 ppm termasuk kategori kuat, fraksi Etil Asetat diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar 59,7951 ppm termasuk kategori kuat, fraksi n-Heksana diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar 117,235 ppm termasuk kategori sedang, serta fraksi air diperoleh  $\text{IC}_{50}$  sebesar 67,915 ppm termasuk kategori kuat.

Berdasarkan hasil nilai  $IC_{50}$ , ekstrak dan fraksi daun melinjo berpotensi mengurangi radikal bebas. Fraksi etil asetat dan fraksi air memiliki potensi kuat antioksidan diperkirakan adanya kandungan senyawa flavonoid atau fenolik dan senyawa-senyawa yang mengandung gugus -OH. Senyawa flavonoid yang diduga golongan antosianin (Utama *et al.*, 2019). Selain itu, daun melinjo mengandung komponen asam-asam lemak (komposisi 1-35% ) yang mengandung gugus -OH yang bertindak sebagai agen antioksidan seperti asam oleat, asam linoleat, asam palmitat, asam stearat dan, asam palmitoleat, dihirosterkulat, asam linolenat dan asam arakidat, malvalat, dan asam sterulat.

Menurut Wijaya (2010), komponen antioksidan yang memiliki gugus hidroksil (-OH) merupakan gugus yang berperan dalam kestabilan radikal bebas. Suatu senyawa polifenol dan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh Posisi dan jumlah gugus hidroksil. Semakin banyak Radikal bebas yang dapat dstabilkan maka semakin banyak electron yang ditransfer dari gugus hidroksil senyawa tersebut. Hal ini terjadi pada ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat dan fraksi air menunjukkan aktivitas antioksidan berpotensi kuat karena gugus-gugus OH senyawa pada sampel lebih bersifat hidrofilik sehingga lebih memungkinkan pelarut air/polar untuk mengikat komponen antioksidan. Namun senyawa nonpolar seperti triterpenoid/steroid tertarik karena juga memiliki gugus OH yang tidak banyak pada senyawa polar. Triterpenoid/ steroid memberikan peran sebagai antioksidan primer dengan mekanisme memutus reaksi berantai dan mengubahnya menjadi produk yang lebih stabil serta mengandung gugus OH.

Fraksi n-heksana menunjukkan kekuatan yang sedang karena dipengaruhi senyawa yang memiliki gugus lipofilik yang panjang. Semakin panjang gugus

lipofilik yang terikat gugus OH maka semakin kurang. Penyebab lain lemahnya aktivitas antioksidan senyawa triterpenoid diduga karena senyawa triterpenoid masih terikat senyawa lain yang mengganggu interaksi transfer elektron dan senyawa triterpenoid memiliki hanya beberapa gugus hidroksil sehingga tidak dapat menstabilkan radikal bebas karena atom hidrogennya jumlahnya lebih sedikit daripada radikal bebas. Oleh karena itu, perlu dilakukan pemurnian atau isolasi dengan agar didapat nilai  $IC_{50}$  dari senyawa spesifik yang memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat bila dibandingkan dengan ekstrak atau fraksi yang belum murni.

## SIMPULAN

Penelitian menunjukkan hasil ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air daun melinjo (*Gnetum Genom, L.*) memiliki kandungan metabolit sekunder meliputi flavonoid, polifenol, Alkaloid, Steroid, triterpenoid dan tanin. Ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat, fraksi n-heksana, dan fraksi Air masing menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar 60,689 ppm, 59,7951 ppm, 117,235 ppm serta 67,915 ppm. dengan metode *cuprac.* Fraksi n-heksana menunjukkan kategori antioksidan sedang. Fraksi Etil asetat, fraksi air dan etanol 96% memiliki aktivitas antioksidan yang kuat sehingga digunakan sebagai langkah awal untuk mengisolasi senyawa murni berperan antioksidan kuat yang dijadikan sebagai kandidat obat.

## SARAN

Penelitian ini harus dikembangkan untuk analisis menggunakan LC-MS untuk mengetahui komposisi komponen yang terdapat pada ekstrak 96%, fraksi etil asetat dan air. Selanjutnya dapat mengisolasi senyawa terbanyak dalam ekstrak etanol 96% dan fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun melinjo (*Gnetum gnenom L.*) dan dilakukan pengujian analisis menggunakan LC-MS, FT-IR,

NMR serta antioksidan menggunakan metode *cuprac*.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada semua pihak yang berkontribusi dalam penelitian ini dengan baik. Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Islam Sultan Agung (Unissula) yang telah memberikan dana anggaran tahun 2022 untuk melakukan penelitian. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada pihak pengelola jurnal yang telah mengevaluasi serta meninjau kembali artikel yang diajukan untuk pertimbangan dalam proses publikasi.

### DAFTAR PUSTAKA

- Achmad Ali Fikri, Syamsul Arifin, M. F. F. (2022). *Uji Aktivitas Antioksidan ekstrak etanol Daun Melinjo (Gnetum genom, l.) Terhadap Tikus Putih Jantan galur wistar yang di induksi CCl<sub>4</sub>, Skripsi*
- Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Bektaşoğlu B, B. M. (2010). No Title. *Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Antioxidants in Human Serum and for Hydroxyl Radical Scavengers.*, 594(215), 39.
- Bharali, P., Dutta, P., Kalita, M. C., Das, A. K., Tag, H., & Baruah, A. M. (2018). Evaluation of Antioxidant and Proximate Compositions of the Leaf Extract of Gnetum Gnemon L. *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(10), 101–105. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0910234>
- Candra Eka Setiawan, N., & Febriyanti, A. (2017). *Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Dan Fraksi-Fraksi Umbi Eleutherine palmifolia (L.) Merr Dengan Metode DPPH (The Antioxidant Activity Of Extract And Fractions Eleutherine palmifolia ( L. ) Merr Bulbs By DPPH Method)*. 1(1), 2598–2095.
- Haeria, Tahar, N., & Munadiah. (2018). Penentuan Kadar Flavonoid Dan Kapasitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (Moringa oleifera L) Dengan Metode DPPH, CUPRAC Dan FRAP. *Jf Fik Unam*, 6(2), 88–97.
- Hafiz Ramadhan, Baidah, D., Lestari, N. P., & Yuliana, K. A. (2020). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol 96% Daun, Buah dan Kulit Terap (Artocarpus odoratissimus) Menggunakan Metode Cuprac. *Farmasains : Jurnal Ilmiah Ilmu Kefarmasian*, 7(1), 7–12. <https://doi.org/10.22236/farmasains.v7i1.4331>
- Hani, R. C., & Milanda, T. (2021). Review: Manfaat Antioksidan pada Tanaman Buah di Indonesia. *Farmaka*, 14(1), 184–190.
- Isnaini, Biworo, A., Khatimah, H., Gufron, K. M., & Puteri, S. R. (2021). Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Ekstrak Galam (Melaleuca cajuputi subsp. Cumingiana (Turcz.) Barlow) terhadap Bakteri E. coli dan Jamur C. albicans. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*, 7(2), 79–83.
- Lamk, R., Zahra, U., & Ilyas, A. (2012). Sekunder Ekstrak N-Heksan dari Umbi Lobak. *Al-Kimia*, 1–9.
- Maharani, A. I., Riskierdi, F., Febriani, I., Kurnia, K. A., Rahman, N. A., Ilahi, N. F., & Farma, S. A. (2021). Peran Antioksidan Alami Berbahan Dasar Pangan Lokal dalam Mencegah Efek Radikal Bebas. *Prosiding Seminar Nasional Bio*, 1(2), 390–399.
- No Title. (n.d.). *Apak R, Güçlü K, Ozyürek M, Bektaşoğlu B, Bener M. Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity Assay for Antioxidants in Human Serum and for Hydroxyl Radical Scavengers. Methods Mol Biol. 2010;594:215-39. Doi: 10.1007/978-1-60761-411-1\_15. PMID: 20072920.*



- Rahmiyani, I., Aprianti, R., & Rahayuningsih, N. (2010). *Antioxidant Activity of Leaves Extracts from Gnetum gnemon Linn Using DPPH*. 77–80. <https://farmasi.uad.ac.id/wp-content/uploads/10.-Antioxydant-Activity-Of-Leaves-Extracts-....pdf>
- Sari, I. R. M. (2012). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jamur Pleurotus Ostreatus dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Fraksi Teraktif. *Skripsi*, 9.
- Septiani, S., Wathoni, N., & Mita, S. R. mita. (2011). Formulasi Sediaan Masker gel Antioksidan Dari Ekstrak Etanol Biji Belinjo. *Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran*, 2–4.
- Tanamal, M. T., Papilaya, P. M., & Smith, A. (2017). Kandungan Senyawa Flavonoid Pada Daun Melinjo (Gnetum Gnemon L.) Berdasarkan Perbedaan Tempat Tumbuh. *Biopendix: Jurnal Biologi, Pendidikan Dan Terapan*, 3(2), 142–147. <https://doi.org/10.30598/biopendixvol3issue2page142-147>
- Utama, S. S., Mulkiya, K., Syafnir, L., Farmasi, P., Matematika, F., Ilmu, D., & Alam, P. (2019). Isolasi Senyawa Flavonoid yang Berpotensi sebagai Antioksidan pada Ekstraksi Bertingkat Daun Melinjo (Gnetum gnemon L.). *Prosiding Farmasi*, 0(0), 717–725. <https://karyailmiah.unisba.ac.id/index.php/farmasi/article/view/18108>
- Werdhasari, A. (2014). Peran Antioksidan Bagi Kesehatan. *Jurnal Biomedik Medisiana Indonesia*, 3(2), 59–68.