

Artikel Penelitian

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Daun Kadamba (*Mitragyna Speciosa* Korth.) Dengan Metode Peredaman ABTS [(2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

Antioxidant Activity Of Kadamba Leaf Extract And Fraction (*Mitragyna speciosa* Korth.) Using ABTS [(2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] Radical Scavenging Method

Viriyana Wijaya *, Helmi

Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda, Indonesia

*Email korespondensi: virii@ff.unmul.ac.id

Abstrak

Penelitian mengenai aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun Kadamba (*Mitragyna speciosa* Korth.) dengan metode peredaman ABTS telah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi daun Kadamba terhadap radikal ABTS. Metode peredaman ABTS dilakukan untuk melihat aktivitas antioksidan dari masing-masing ekstrak dan fraksi. Daun Kadamba diekstraksi dengan metanol dan difraksinasi menggunakan n-heksana, etil asetat dan n-butanol. Penelitian ini memperlihatkan hasil yakni nilai IC₅₀ dari ekstrak kering, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi n-butanol berturut-turut sebesar 81,417 ppm; 60,050 ppm; 96,059 ppm; dan 160,673 ppm. Ekstrak metanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat menghasilkan aktivitas antioksidan yang kuat yaitu IC₅₀ berada pada rentang 50 hingga 100 ppm sedangkan fraksi n-butanol menghasilkan aktivitas antioksidan yang lemah dengan IC₅₀ lebih besar dari 150 ppm.

Diterima: 26 April 2025

Disetujui: 29 Mei 2025

Publikasi : 31 Mei 2025

Copyright : © 2025, Jurnal Sains dan Kesehatan (J. Sains.Kes.). Published by Faculty of Pharmacy, University of Mulawarman, Samarinda, Indonesia. This is an Open Access article under the CC-BY-NC License



Kata kunci: daun Kadamba, antioksidan, ABTS, IC₅₀

Abstract

Research about the antioxidant activity of Kadamba leaf extract and fractions (*Mitragyna speciosa* Korth.) using the ABTS scavenging method has been conducted. The purpose of this study was to determine antioxidant activity of Kadamba leaf extract and fractions against ABTS radicals. The ABTS scavenging method was conducted to see the antioxidant activity of each extract and fraction. Kadamba leaves were extracted with methanol and fractionated using n-hexane, ethyl acetate and n-butanol. This study showed the results, namely the IC₅₀ values of dry extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and n-butanol fraction were 81.417 ppm; 60.050 ppm; 96.059 ppm; and 160.673 ppm, respectively. Methanol extract, n-hexane fraction and ethyl acetate

fraction produced strong antioxidant activity, namely IC₅₀ in the range of 50 to 100 ppm, while the n-butanol fraction produced weak antioxidant activity with IC₅₀ greater than 150 ppm.

Keywords: Kadamba leaves, antioxidant, ABTS, IC₅₀

1 Pendahuluan

Genus *Mitragyna* termasuk ke dalam sub famili Cinchonoidaeae dan famili Rubiaceae. Genus *Mitragyna* telah dideterminasi menjadi 4 spesies di Thailand menjadi *M. diversifolia*, *M. hirsuta*, *M. rotundifolia*, dan *M. speciosa* [1]. Genus *Mitragyna* telah digunakan secara tradisional di bagian Afrika, Asia, dan Oceania. Beberapa spesies *Mitragyna* juga telah dilaporkan untuk mengobati nyeri dengan menggunakan produk sediaan topikal antara lain salep, balsem, dan tingtur. Penggunaan *Mitragyna* lainnya ditujukan dalam pengobatan demam, infeksi kulit, dan ansiolitik ringan [2].

M. speciosa Korth. merupakan suatu tanaman yang berasal dari Asia Tenggara, pada umumnya tumbuh di daerah Thailand, Malaysia, dan Indonesia. *M. speciosa* telah digunakan secara tradisional sebagai obat herbal dengan potensi analgesik, pengobatan ketergantungan opioid, ansiolitik, antidepresan, dan antibiotik [3]. *M. speciosa* mengandung lebih dari 40 senyawa alkaloid dengan 2 senyawa utama yang paling banyak dilakukan penelitian yaitu mitraginin dan 7-hidroksimitraginin. Mitraginin dan 7-hidroksimitraginin memiliki fungsi sebagai agonis parsial pada reseptor opioid manusia [4].

M. speciosa merupakan tanaman yang menarik untuk diteliti dan dikembangkan lebih lanjut karena kandungan kimia serta khasiatnya sehingga penelitian tentang aktivitas biologis perlu dilakukan, terutama aktivitas antioksidan. Aktivitas antioksidan pada ekstrak daun Kadamba terhadap DPPH telah dipublikasi dan dilaporkan [5], sedangkan pengujian dengan metode ABTS masih minim informasi mengenai aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksinya.

ABTS adalah suatu substrat peroksidase yang mengalami reaksi oksidasi dengan hidrogen peroksida dalam pembentukan radikal kation. Selain itu, ABTS mempunyai sifat kimia berupa larut dalam air dan lipid dan cenderung stabil. Aktivitas antioksidannya dapat terlihat dari warna ABTS yang semakin hilang dengan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer [6]. Oleh karena itu, pengujian aktivitas antioksidan daun *M. speciosa* terhadap radikal ABTS perlu dilakukan untuk menambah informasi data ilmiah terhadap tanaman ini.

2 Metode Penelitian

2.1 Alat dan Bahan

Beberapa peralatan/instrumen yang digunakan pada penelitian antara lain timbangan analitik (Precisa XB 220 A) untuk menimbang bobot ekstrak dan fraksi, rotary evaporator vacuum (Buchi) untuk memekatkan ekstrak hasil maserasi dan fraksinasi, spektrofotometer UV-vis (Dynamica Halo 20DBS) untuk mengukur absorbansi peredaman radikal ABTS serta alat-alat gelas dan kaca yang umum dipakai di laboratorium.

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian diantaranya beberapa pelarut organik seperti metanol, n-heksan, etil asetat, dan n-butanol dan aquades sebagai pelarut fraksinasi, radikal ABTS, dan Kalium persulfat (K₂S₂O₈).

2.2 Pengumpulan Bahan Tumbuhan

Pengambilan sampel daun Kadamba dilakukan di Kecamatan Kota Bangun, Desa Liang, Kabupaten Kutai Kartanegara. Jumlah sampel segar daun yang diperoleh sebesar 13 kg. Sampel berupa daun Kadamba telah dibersihkan dari kotoran dan disortir sebagai daun yang layak dijadikan sampel uji. Setelah itu, daun dikeringkan di dalam ruangan serta diangin-anginkan yang bebas dari paparan sinar matahari secara langsung. Hasil pengeringan sampel daun diperoleh bobot sebesar 2,453 kg dan sampel dapat dipotong kecil-kecil.

2.3 Pembuatan Ekstrak Sampel

Sampel daun Kadamba yang telah dipotong kemudian ditimbang pada timbangan digital. Jumlah simplisia daun Kadamba yang digunakan untuk proses ekstraksi sebesar 2 kg. Kemudian, sampel kering daun diekstraksi dengan metanol 20 L menggunakan metode maserasi. Ekstrak metanol dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak pekat. Selanjutnya ekstrak dikeringkan menggunakan *waterbath* dan diangin-anginkan hingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak kering yang diperoleh kemudian disimpan dalam wadah tertutup rapat dan terhindar dari cahaya. Ekstrak kering daun Kadamba diperoleh sebesar 51 g.

2.4 Fraksinasi Ekstrak

Ekstrak kasar yang diperoleh dari hasil maserasi dilakukan fraksinasi cair-cair sebanyak 10 g dengan pelarut secara berurutan yaitu n-heksana 250 mL, etil asetat 250 mL, n-butanol 250 mL, dan air 250 mL. Fraksinasi dimulai dari pelarut non polar ke pelarut yang paling polar. Fraksi yang diperoleh kemudian diangin-anginkan. Hasil pengeringan fraksi didapatkan fraksi n-heksana, etil asetat dan n-butanol yang akan digunakan untuk aktivitas antioksidan.

2.5 Pembuatan larutan radikal ABTS

Larutan radikal ABTS dibentuk dengan mereaksikan kation ABTS 7 mili Molar dan $K_2S_2O_8$ 2,45 mili Molar yang dibuat dengan cara masing-masing dilarutkan dalam 5 mL aquades. Kedua larutan kemudian dicampur serta dihomogenkan. Kemudian diinkubasi dalam durasi 12-16 jam pada temperatur tertentu dalam ruang gelap.

2.6 Penentuan Absorbansi Radikal ABTS

Larutan radikal ABTS diambil 1 mL kemudian diencerkan dalam 50 mL metanol pada labu ukur gelap. Diukur absorbansi pada panjang gelombang 731-735 nm dengan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian, diperoleh panjang gelombang maksimum 734 nm dengan absorbansi 0,700.

2.7 Penyiapan larutan blanko

Blanko disiapkan dengan memasukkan 0,3 mL metanol p.a ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2,7 mL ABTS yang diambil dari larutan stok ABTS. Setelah itu, dihomogenkan dengan vorteks serta diinkubasi selama 30 menit di tempat yang gelap.

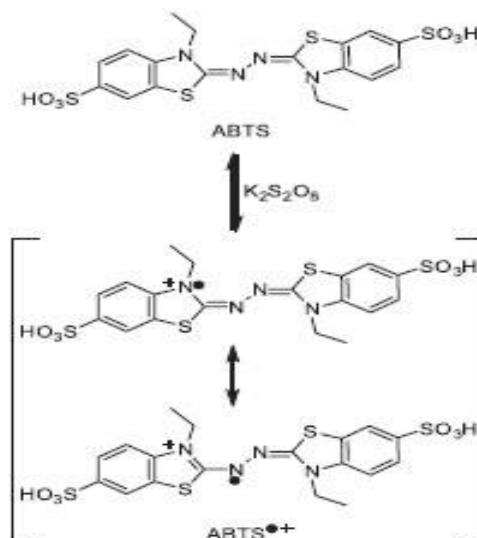
2.8 Pengujian Antioksidan

Ekstrak daun Kadamba diambil 0,3 mL, kemudian ditambahkan dengan 2,7 mL larutan radikal ABTS ke dalam tabung reaksi kemudian dihomogenkan dan diinkubasi di tempat gelap dalam temperatur kamar selama 30 menit. Setelah itu, dimasukkan ke dalam kuvet untuk diuji dengan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi blanko dan ekstrak dilakukan setelah penentuan panjang gelombang maksimum.

3 Hasil dan Pembahasan

ABTS merupakan suatu radikal bebas dengan inti nitrogen yang memiliki karakteristik warna biru kehijauan dan apabila tereduksi oleh senyawa antioksidan akan mengalami perubahan ke dalam bentuk non radikal (perubahan warna terlihat dari yang berwarna menjadi tidak berwarna). Daya antioksidan dapat terlihat pada spektrofotometer dengan panjang gelombang sekitar 734 nm [7].

$ABTS^{+}$ dihasilkan dari oksidasi ABTS umumnya menggunakan kalium persulfat ($K_2S_2O_8$). Pengujian ABTS dapat dilakukan pada senyawa murni dan campuran kompleks, dan kapasitas antiradikal digambarkan dengan nilai IC_{50} . Pengujian ABTS menghasilkan campuran sampel yang berwarna pekat dan absorbansinya diukur di luar range spektrum visibel atau dekat area infrared [8].



Gambar 1. Oksidasi ABTS oleh Kalium Persulfat menghasilkan kation radikal $ABTS^{\bullet+}$ [8]

Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak metanol, fraksi n-heksan, etil asetat serta n-butanol dilakukan dengan berbagai seri konsentrasi menggunakan metode peredaman ABTS dan absorbansinya diperoleh dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran absorbansi sampel uji dilakukan dalam 3 replikasi (triplo).

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah % peredaman ABTS oleh ekstrak sampel yang direpresentasikan dalam bentuk IC_{50} . Data tersebut diperoleh dari absorbansi sampel yang dihitung dengan persamaan berikut:

$$\% \text{ Aktivitas antioksidan} = \frac{\text{Absorbansi blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Data setiap sampel dilanjutkan dengan analisa statistik yang menggunakan regresi linier sederhana hingga didapatkan nilai IC_{50} dalam satuan ppm. Analisa data menggunakan regresi linear dengan persamaan:

$$y = b(x) + a$$

Keterangan formula:

y = persentase peredaman radikal ABTS

b = slope

(x) = konsentrasi sampel

a = intersep

Hasil pengukuran absorbansi masing-masing ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 1. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kadamba

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Rata-Rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC_{50} (ppm)
50	0,459	37,037	81,417
100	0,320	56,104	
150	0,188	74,211	
200	0,095	86,968	
250	0,063	91,358	
Blanko	0,729		

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-heksan Daun Kadamba

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Rata-Rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm)
50	0,392	44,318	60,050
100	0,233	66,903	
150	0,128	81,818	
200	0,019	97,301	
Blanko	0,704		

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi etil asetat Daun Kadamba

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Rata-Rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm)
50	0,477	29,542	96,059
100	0,301	55,539	
150	0,198	70,753	
200	0,092	86,411	
250	0,036	94,862	
Blanko	0,677		

Tabel 4. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi n-butanol Daun Kadamba

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Rata-Rata	Aktivitas Antioksidan (%)	IC ₅₀ (ppm)
100	0,496	27,591	160,673
150	0,345	49,635	
200	0,235	65,693	
250	0,155	77,372	
300	0,078	88,613	
Blanko	0,685		

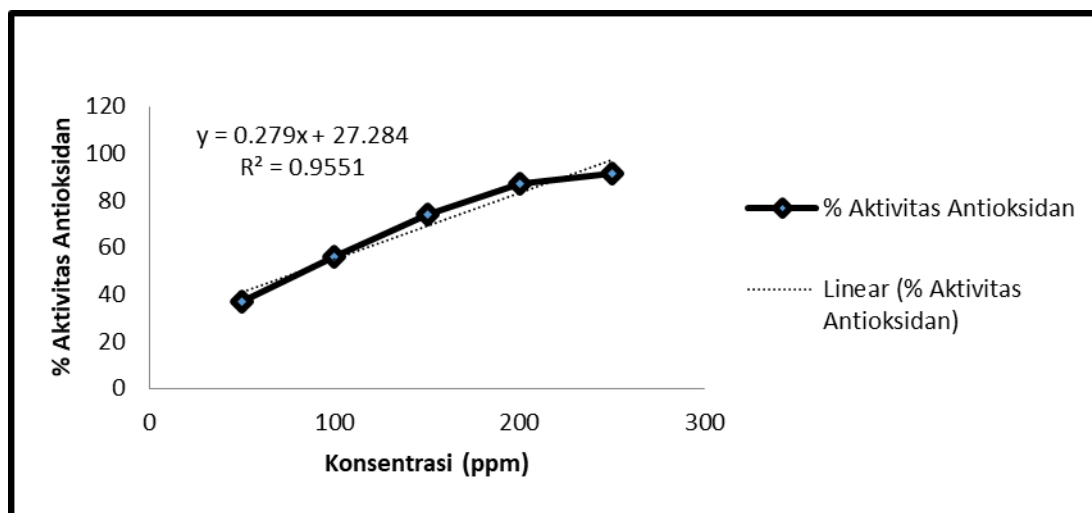
Menurut hasil pengujian aktivitas antioksidan yang diperoleh dari tabel tersebut, diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak metanol dan fraksi n-heksana, etil asetat, dan n-butanol masing-masing sebesar 81,417 ppm; 60,050 ppm; 96,059 ppm; dan 160,673 ppm. Fraksi n-heksana memiliki nilai IC₅₀ lebih rendah daripada ekstrak metanol. Hal ini disebabkan ekstrak metanol mengandung akumulasi senyawa non polar dan polar. Ketika ekstrak dipisahkan secara fraksinasi, maka senyawa akan larut mengikuti prinsip *like dissolve like* yang menyebabkan senyawa aktif akan terpartisi ke dalam masing-masing fraksi. Senyawa non polar yang terdapat dalam fraksi n-heksana lebih aktif daripada senyawa polar pada fraksi etil asetat dan n-butanol. Hal ini dibuktikan bahwa daun kadamba mengandung banyak senyawa alkaloid yang umumnya mempunyai sifat non-polar sehingga cenderung untuk larut dalam n-heksana sebagai pelarut non polar. Hal ini menyebabkan fraksi n-heksana mengandung alkaloid yang berkontribusi untuk menghasilkan efek farmakologi. Menurut Chear et al., 2021 telah diidentifikasi sekitar 10 senyawa alkaloid pada tanaman ini dengan perbedaan struktur molekul dengan senyawa utama mitraginin dengan komposisi 66% dari total alkaloid, spesioginin dan paynantenin (16%), dan sisanya mengandung korynoksine, korynoksine B, isospesiofolin, mitraginin oxindole B, hidroksimitraginin, korynantheidin, spesiosiliatin dan spesiosiliatin N(4)-oksida. Kehadiran alkaloid yang berbeda-beda tiap tanaman *M. speciosa* umumnya dipengaruhi oleh kondisi lingkungan, meliputi iklim, tipe tanah, dan tekanan lingkungan [9]. Selain alkaloid, daun Kadamba juga mengandung flavonoid, turunan glikosida, triterpenoid, saponin dan tanin [5].

Kekuatan aktivitas antioksidan berhubungan dengan besaran nilai IC₅₀. Adapun nilai IC₅₀ yang dihasilkan menurut tingkat kekuatan aktivitas antioksidan dibedakan menjadi 5 kriteria secara umum

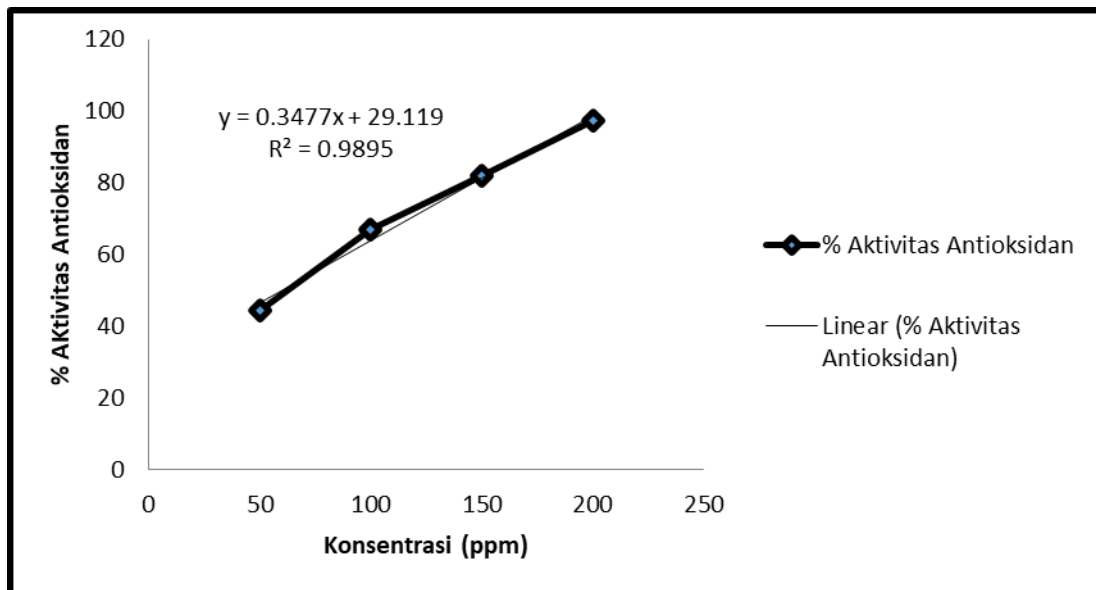
diantaranya IC_{50} di bawah 50 ppm (sangat kuat), IC_{50} dengan kisaran 50-100 ppm (kuat), IC_{50} dengan kisaran 100 ppm-150 ppm (sedang), IC_{50} dengan kisaran 150 ppm-200 ppm (lemah), dan IC_{50} di atas 200 ppm (sangat lemah). Sifat antioksidan suatu senyawa dikatakan aktif apabila nilai IC_{50} lebih kecil dari 200 ppm. Bila nilai IC_{50} yang didapatkan berada pada rentang antara 200 sampai 1000 ppm, maka zat tersebut masih berpotensi sebagai zat antioksidan [10]. Nilai IC_{50} memperlihatkan bahwa ekstrak metanol, fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat sedangkan fraksi n-butanol mempunyai aktivitas antioksidan yang lemah. Fraksi n-heksana merupakan fraksi yang paling tinggi dalam menghasilkan daya antioksidan terhadap radikal ABTS. Nilai IC_{50} pada fraksi n-heksana menunjukkan kemampuan senyawa non polar dalam menghambat 50% radikal ABTS.

Jika dibandingkan dengan nilai IC_{50} ekstrak metanol yang diperoleh pada pengujian aktivitasnya sebesar 81,417 ppm (>50 ppm), ini menunjukkan hasil yang berbeda pada penelitian sebelumnya menggunakan metode DPPH pada ekstrak etanol daun Kadamba dengan diperolehnya nilai IC_{50} sebesar 38,56 ppm (<50 ppm) yang menunjukkan kategori sangat kuat [5]. Hal ini diduga oleh kandungan senyawa alkaloidnya lebih banyak berkontribusi dalam menghambat radikal DPPH dibandingkan ABTS. Selain itu, sensitifitas radikal ABTS terhadap lingkungan lebih rendah daripada radikal DPPH, sehingga dapat menimbulkan perubahan kecil pada paparan cahaya, pelarut, pH, dan suhu yang menyebabkan absorbansi radikal DPPH dapat menurun yang dapat meningkatkan nilai aktivitas antioksidannya [11].

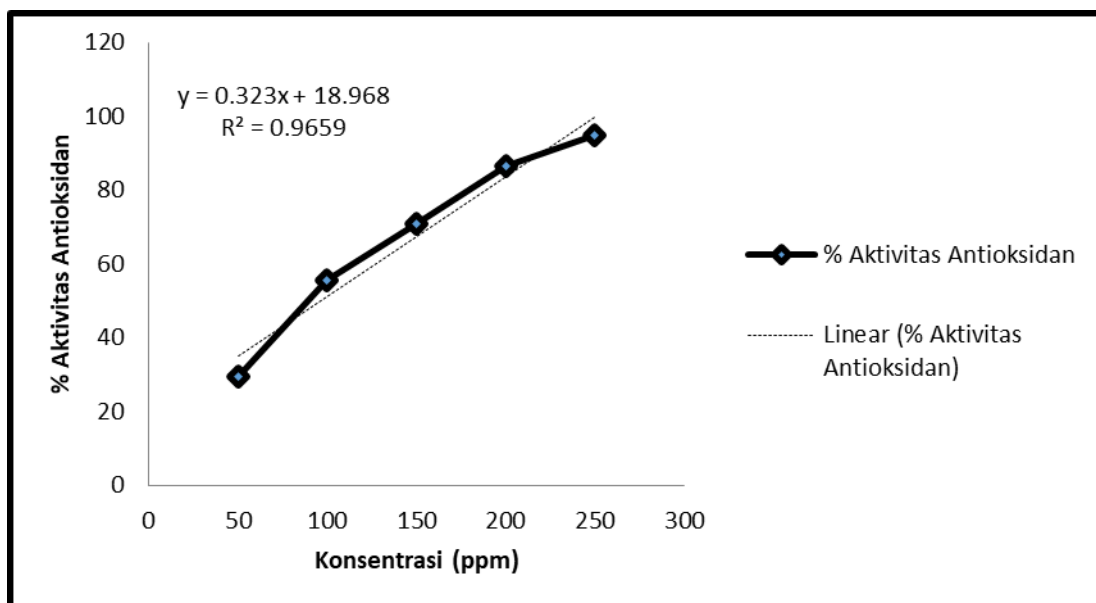
Hubungan konsentrasi dengan % aktivitas antioksidan masing-masing ekstrak dan fraksi digambarkan dalam grafik berikut:



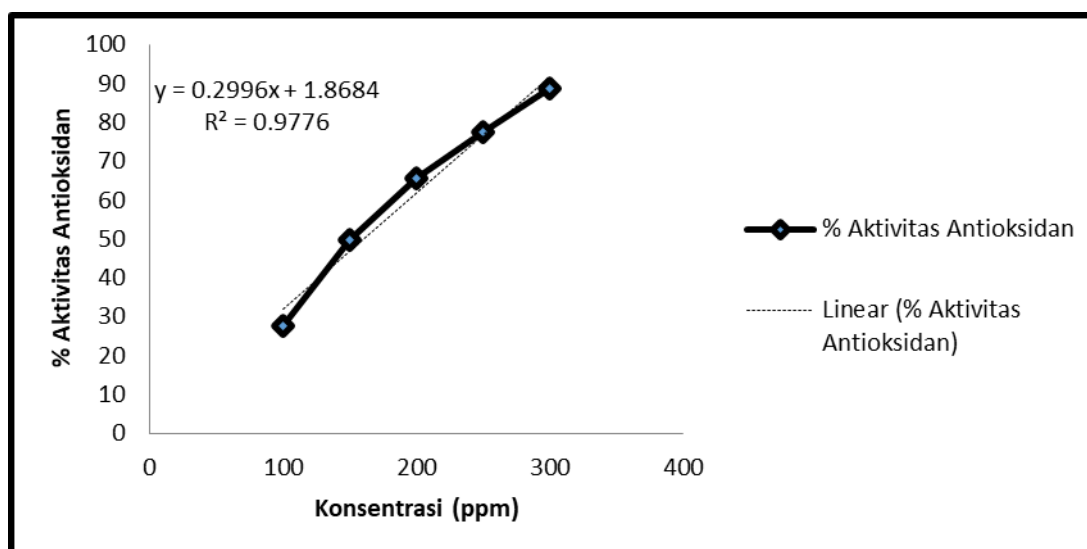
Gambar 2. Grafik % Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kadamba



Gambar 3. Grafik % Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Daun Kadamba



Gambar 4. Grafik % Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Kadamba



Gambar 5. Grafik % Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Butanol Daun Kadamba

Nilai R^2 pada masing-masing grafik menunjukkan linieritas konsentrasi terhadap % aktivitas antioksidan. Nilai R^2 mendekati 1 maka kedua variabel (konsentrasi dan % aktivitas antioksidan) mempunyai hubungan yang semakin kuat. Keterkaitan antar dua variabel memiliki standar yaitu nilai 0 menunjukkan tidak adanya hubungan, lebih dari 0 sampai 0,25 (hubungan yang sangat lemah), lebih dari 0,25 sampai 0,5 (hubungan yang cukup), lebih dari 0,5 sampai 0,75 (hubungan yang kuat), lebih dari 0,75 sampai 0,99 (hubungan yang sangat kuat), dan 1 (hubungan yang sempurna) [12]. Dari nilai R^2 yang ditunjukkan dalam grafik, maka hubungan konsentrasi dengan % aktivitas antioksidan sangat kuat.

4 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa nilai IC_{50} ekstrak metanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi n-butanol masing-masing sebesar 81,417 ppm; 60,050 ppm; 96,059 ppm; dan 160,673 ppm. Fraksi n-heksana merupakan fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan paling tinggi terhadap radikal ABTS.

5 Pernyataan

5.1 Penyandang Dana

Penyandang dana pada penelitian adalah Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman.

5.2 Kontribusi Penulis

Semua penulis terlibat mulai dari pencarian referensi, penulisan artikel, dan proses pengeditan artikel.

5.3 Konflik Kepentingan

Tidak ditemukan adanya konflik kepentingan dalam penelitian.

6 Daftar Pustaka

- [1] Puff, C., et al., 2021. *Rubiaceae Part 1 (Genera 1-45)*. Forest Herbarium.
- [2] Brown, P.N., J.A. Lund, and S.J. Murch, 2017. *A botanical, phytochemical and ethnomedicinal review of the genus Mitragyna korth: Implications for products sold as kratom*. Journal of Ethnopharmacology, **202**: p. 302-325.
- [3] Rusydan, A.M., E. Lukitaningsih, and N. Fakhrudin, 2022. *Mitragyna speciosa: Opioid Addiction Treatment and Risk of Use*. JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research. **7**(2): p. 238-256.

- [4] Todd, D.A., et al., 2020. *Chemical composition and biological effects of kratom (Mitragyna speciosa): In vitro studies with implications for efficacy and drug interactions*. Scientific Reports, **10**(1): p. 19158.
- [5] Yuniarti, R., et al., 2020. *Characterization, Phytochemical Screenings and Antioxidant Activity Test of Kratom Leaf Ethanol Extract (Mitragyna speciosa Korth) Using DPPH Method*. Journal of Physics: Conference Series, **1462**(1): p. 012026.
- [6] Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, 2015. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford university press.
- [7] Liangli, L.Y., 2008. *Wheat antioxidants*. John Wiley & Sons.
- [8] Oliveira, S.d., et al., 2014. *Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts*. Química Nova, **37**: p. 497-503.
- [9] Chear, N.J.-Y., et al., 2021. *Exploring the Chemistry of Alkaloids from Malaysian Mitragyna speciosa (Kratom) and the Role of Oxindoles on Human Opioid Receptors*. Journal of Natural Products, **84**(4): p. 1034-1043.
- [10] Molyneux, P., 2004. *The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity*. Songklanakarin J. sci. technol, **26**(2): p. 211-219.
- [11] Rumpf, J., R. Burger, and M. Schulze, 2023. *Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins*. International Journal of Biological Macromolecules, **233**: p. 123470.
- [12] Sarwono, J., 2006. *Metode penelitian kuantitatif dan kualitatif*. Yogyakarta: Graha Ilmu.