



Artikel Penelitian

Karakterisasi Fraksi Aktif Antioksidan Dari Biji Gandaria (*Bouea macrophylla*)

Maidah Nopiana¹, Erica Mutiara Putri¹, Annastaya Novariyani¹, Iip Pahrudin¹, Candra Junaedi¹, Tarso Rudiana^{2*}¹Program Studi Farmasi, Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan, Universitas Mathla'ul Anwar, Pandeglang, Banten, Indonesia, 42273²Program Studi Kimia, Fakultas Sains, Farmasi dan Kesehatan, Universitas Mathla'ul Anwar, Pandeglang, Banten, Indonesia, 42273**INFO ARTIKEL****ABSTRAK****Article History**

Received 01 October 2022

Revised 28 Desember 2022

Available online 29 March 2023

* Penulis korespondensi:
tarso.rudiana@gmail.com

Gandaria (*Bouea macrophylla*) plants contain antioxidant compounds that can reduce free radicals. Free radicals are one of the causes of various degenerative diseases. The purpose of this study was to determine the fraction that had the highest antioxidant activity, and to determine the secondary metabolites contained in the most active fraction of *B. macrophylla* seeds based on LCMS/MS analysis. Maceration of *B. macrophylla* seeds with ethanol solvent. Ethanol maserate was concentrated and fractionated by liquid-liquid extraction method using *n*-hexane, ethyl acetate and ethanol as solvents. Antioxidant activity was measured by the free radical scavenger method with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil as a source of radicals and characterization of the secondary metabolites contained in the most active fraction using a Liquid Chromatography-Mass Spectrometer. *B. macrophylla* seed ethanol extract has a % yield of 31.75%. The ethyl acetate fraction of *B. macrophylla* seeds has the highest mass compared to other fractions and has strong antioxidant activity with an IC₅₀ value of 2.95 ppm. The ethyl acetate fraction of *B. macrophylla* seeds contains tannins, phenolic, flavonoid dan alkaloid compounds. Based on the results of the identification of secondary metabolites by LC-MS/MS, the ethyl acetate fractions of *B. macrophylla* seeds contained phenylalaline compounds.

Keywords: antioxidant; *Bouea macrophylla*; DPPH; fraksi;

Tanaman gandaria (*Bouea macrophylla*) mempunyai kandungan senyawa antioksidan yang dapat meredam radikal bebas. Radikal bebas merupakan salah satu penyebab timbulnya berbagai penyakit degeneratif. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi, dan menentukan senyawa metabolit sekunder yang terkandung pada fraksi teraktif biji *B. macrophylla* berdasarkan analisis LCMS/MS. Maserasi biji *B. macrophylla* dengan pelarut etanol. Maserat etanol dipekatkan dan difraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat dan etanol. Aktivitas antioksidan diukur dengan metode *free radical scavenger* dengan 1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil sebagai sumber radikal serta karakterisasi metabolit sekunder yang terkandung pada fraksi teraktif biji *B. macrophylla* dengan menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometer*. Ekstrak etanol biji *B. macrophylla* memiliki % rendemen sebesar 31,75 %. Fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* memiliki masa paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lain serta memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC₅₀ sebesar 2,95 ppm. Fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* mengandung senyawa tanin, fenolik, flavonoid dan alkaloid. Berdasarkan hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan LC-MS/MS

menunjukkan fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* mengandung senyawa *phenylalaline*.

Kata kunci: antioksidan; *Bouea macrophylla*; DPPH; fraction

1. Pendahuluan

Dalam kehidupan sehari-hari, kita tidak jauh dari senyawa radikal bebas. Sumber pembentuk radikal bebas yang terdapat di lingkungan kita diantaranya polusi udara, makanan yang dibakar dan digoreng, dan paparan berlebih sinar violet yang bersumber dari matahari. Radikal bebas berbahaya bagi tubuh karena dapat mengikat elektron yang terdapat pada sel melalui reaksi oksidasi [1]. Penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas salah satunya yaitu penyakit degeneratif.

Penyakit degeneratif ialah penyakit tidak menular yang berlangsung kronis seperti penyakit jantung, hipertensi, diabetes, obesitas dan lainnya [2]. Pengobatan *back to nature* sudah menjadi trend di dunia kesehatan. Tanaman gendaria *Bouea macrophylla* mengandung senyawa yang dapat berperan sebagai meredam radikal bebas yang dikenal dengan istilah antioksidan [3].

B. macrophylla mengandung alkaloid, terpenoid, golongan fenol, flavonoid, kuinon tanin dan saponin. Ekstrak etil asetat batang *B. macrophylla* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 4,89 $\mu\text{g/mL}$ [4], mengandung senyawa naringenin dan luteolin [5], Lauric dietolamide dan loganin [6], fustin [7]. Ekstrak metanol buah *B. macrophylla* memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 16,29 mg/mL [8] dan ekstrak jus buah *B. macrophylla* sebesar 36,3 mg/mL [9].

Tanaman *B. macrophylla* berpotensi sebagai sumber antioksidan alami [4]. Antioksidan yang berperan diantaranya senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder dalam tanaman tersebar hampir sama pada bagian jaringan tanaman seperti pada daun, buah, bunga, biji, akar dan batang. Eksplorasi senyawa metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan pada biji *B. macrophylla* belum banyak dilakukan sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut.

2. Alat, bahan dan Metode

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat gelas laboratorium, vakum *rotary evaporator* (Heidolf), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), LCMS/MS (ACQUITY UPLC® BEH C18 column). Bahan yang digunakan diantaranya biji *B. macrophylla*, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrasil) (Merck), Kuersetin (Sigma Aldrich), akuades, asam klorida (Merck), pita magnesium, reagen Wagner, reagen Mayer, ferri clorida 1%, isoamil alkohol, Pelarut (*n*-heksana, etil asetat dan etanol) grade teknis terdestilasi.

2.2 Preparasi, Ekstraksi dan Fraksinasi Biji *B. macrophylla*

Biji *B. macrophylla* dikumpulkan dari Desa Majau, Kecamatan Saketi, Kabupaten Pandeglang, Provinsi Banten yang berasal dari 1 pohon. Biji *B. macrophylla* dipisahkan dari buah matang, biji *B. macrophylla* disortasi dicuci pada air mengalir dan dirajang. Biji *B. macrophylla* dikeringkan dan dihaluskan menggunakan grinder dan diayak menggunakan mesh 60.

Sampel halus biji *B. macrophylla* (800 g) dimaserasi dengan menggunakan pelarut etanol selama 5x24 jam. Pelarut diganti setiap 1x24 jam dengan etanol yang baru kemudian disaring. Maserat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan dengan vakum *rotary evaporator*.

Ekstrak pekat etanol biji *B. macrophylla* dilarutkan dengan etanol:air (2:8) dengan perbandingan sampel dan pelarut 1:1 (b/v). Larutan diekstraksi cair-cair dengan pelarut *n*-heksana kemudian dipisahkan. Residu dipraktisi dengan pelarut etil asetat dan dipisahkan. Fraksi yang didapatkan diantaranya fraksi *n*- heksana, etil asetat dan residu etanol-air. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan vakum *rotary evaporator*.

2.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Free Radical Scavenger

Ekstrak biji *B. macrophylla* dilarutkan dalam metanol dan dibuat deret konsentrasi. Masing-masing larutan sampel sebanyak 5 mL ditambahkan DPPH 0,002% sebanyak 5 mL. Larutan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang. Larutan diukur absorbansinya pada Panjang gelombang 515 nm. Kuersetin sebagai kontrol positif diukur dan dianalisis dengan metode yang sama Nilai IC_{50} dihitung melalui persamaan garis linier dari grafik hubungan antar konsentrasi dengan % peredaman DPPH. Besarnya % inhibisi DPPH dihitung dengan rumus:

$$\% \text{inhibisi} = \frac{\text{absorbansi blanko} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi blanko}} \times 100\% \quad (1)$$

Konsentrasi sampel dan persen penghambatan masing-masing diplot pada sumbu x dan y yang selanjutnya ditentukan persamaan regresi linearnya. Persamaan yang didapatkan digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} (*Inhibitor concentration 50%*) [10].

2.4 Skrining Fitokimia

Identifikasi fitokimia berdasarkan [11] meliputi identifikasi flavonoid, alkaloid dengan pereaksi Wagner dan Mayer, saponin, tanin, fenolik dan triterpenoid/steroid.

2.5 Karakterisasi Fraksi dengan LC-MS/MS

Sebanyak 1 mg fraksi teraktif biji *B. macrophylla* dilarutkan dalam 20 μL metanol. Larutan fraksi kemudian diinjeksikan pada LC-MS/MS sebanyak 10 μL melalui kolom C-18 oktadesil silica (ODS) dengan laju alir 0.2 mL/menit, metode ionisasi ESI, dan detector MS tipe QTOF. Fasa gerak digunakan campuran pelarut asetonitril 0,1% dengan air 0,1% dengan sistem elusi isokratik. Interpretasi data dilakukan menggunakan software masslynx dan library MONA, serta massbank [6].

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Ekstraksi dan Fraksinasi

Sampel biji *B. macrophylla* dipisahkan dari buah yang matang. Buah yang matang berwarna kuning. Biji *B. macrophylla* disortasi basah, dirajang dan dicuci pada air mengalir untuk memisahkan daging buah yang menempel pada biji. Biji *B. macrophylla* dikeringkan untuk mengurangi kadar air. Sampel kering kemudian dihaluskan diayak menggunakan mesh 60. Sampel dihaluskan bertujuan untuk memperbesar kontak antara permukaan partikel sampel dengan pelarut dan mempermudah penetrasi pelarut ke dalam sampel sehingga dapat menarik senyawa-senyawa metabolit sekunder dari simplisia lebih banyak [12].

Biji *B. macrophylla* dimaserasi dengan etanol. Maserat dipekatkan sehingga didapatkan rendemen sebesar 31,75 %. Indriani et al (2018) melakukan ekstraksi terhadap biji *B. macrophylla* dengan pelarut etanol namun hanya menghasilkan rendemen sebesar 17,8 % [13]. Besarnya rendemen yang dihasilkan pada penelitian ini disebabkan karena proses maserasi yang dilakukan secara optimal. Waktu maserasi dilakukan selama 5x24 jam. Proses maserasi dihentikan sampai maserat tidak berwarna sehingga dimungkinkan senyawa sudah terekstrak semua.

Ekstrak etanol biji *B. macrophylla* difraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair dengan pelarut *n*-heksana, dan etil asetat. Massa fraksi dari masing-masing diperoleh fraksi *n*-heksana sebesar 1,22 g; fraksi etil asetat 68,54 g, dan fraksi etanol-air sebesar 3,27 g. Perbedaan massa pada masing-masing fraksi, dikarenakan perbedaan polaritas dan kelarutan senyawa dalam pelarut, sesuai dengan prinsip *like dissolve like*. Penggunaan pelarut yang bertingkat berdasarkan perbedaan kepolaran dapat menghasilkan rendemen yang berbeda-beda, hal tersebut diakibatkan oleh kelarutan senyawa metabolit sekunder pada masing-masing pelarut. Pelarut organik dibedakan menjadi pelarut polar dan nonpolar. Tingginya konstanta dielektrik menyebabkan suatu pelarut akan bersifat semakin polar [14].

Fraksi etil asetat memiliki massa paling besar hal ini menunjukkan bahwa pada ekstrak etil asetat mengandung jumlah senyawa paling banyak. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel biji *B. macrophylla* banyak mengandung senyawa semipolar seperti tanin, flavonoid termetilasi, flavonoid aglikon, dan beberapa senyawa alkaloid [4].

3.2 Aktivitas Antioksidan Fraksi *B. macrophylla*

Masing-masing fraksi biji *B. macrophylla* diuji kemampuan meredam radikal bebas DPPH. Hasil analisis antioksidan disajikan pada table 1.

Tabel 1. Hasil analisis antioksidan

Sampel	Nilai IC_{50} (ppm)
<i>n</i> -heksana	3,04
Etil asetat	2,95
Etanol-air	21,50
Kuersetin	5,35

Fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* memiliki nilai aktivitas terbaik dibandingkan dengan fraksi lain. Fraksi etil asetat mengandung banyak senyawa antioksidan. Suatu fraksi/esktrak memiliki aktivitas sangat aktif apabila memiliki nilai IC₅₀ kurang dari 50 ppm [10], sehingga berdasarkan penggolangan tersebut, semua fraksi biji *B. macrophylla* termasuk pada aktivitas sangat aktif.

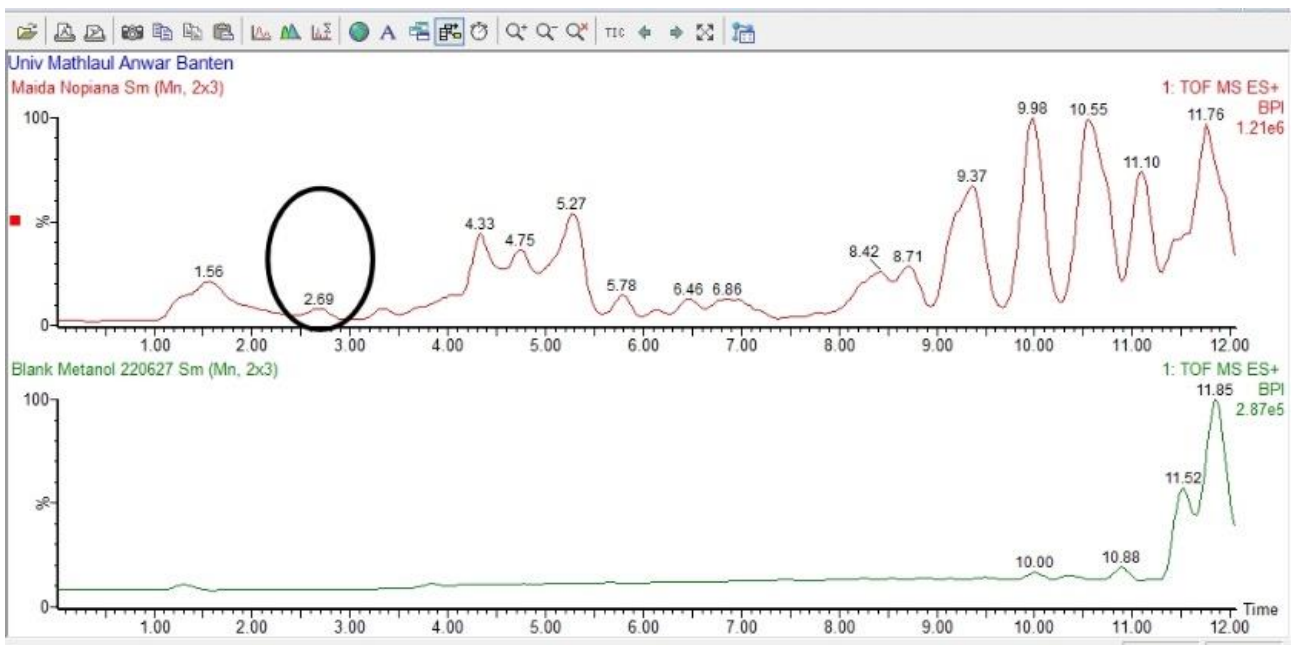
3.3 Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Teraktif

Metabolit sekunder yang terdapat pada fraksi etil asetat biji *Bouea macrophylla* berdasarkan hasil uji skrining fitokimia berupa flavonoid, tanin, fenolik, dan alkaloid pada uji mayer serta negatif untuk saponin dan alkaloid (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia

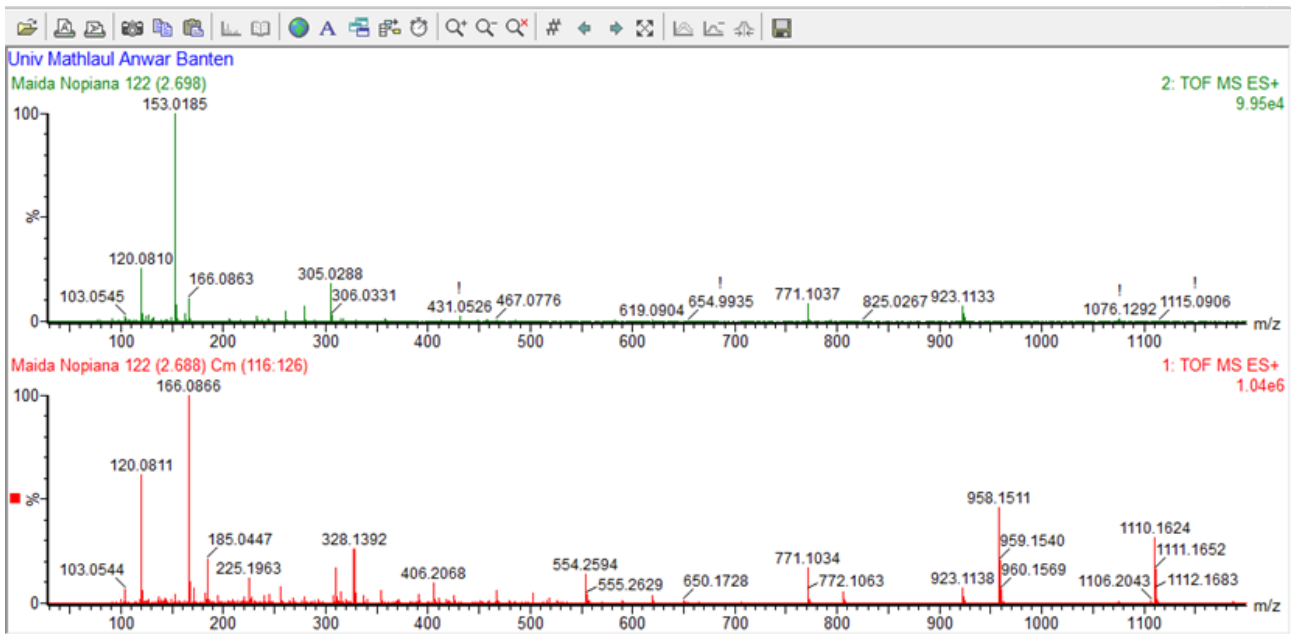
Pengujian	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
Saponin	Akuades + HCl	Tidak timbul busa	-
Tanin	FeCl ₃	Timbulnya warna hitam kehijauan	+
Alkaloid	Wagner	Tidak ada endapan coklat	-
	Mayer	Tidak ada endapan putih	+
Fenolik	FeCl ₃	Timbulnya warna ungu	+
Flavonoid	HCl + Mg	Timbulnya warna jingga pada lapisan isoamil alkohol	+

Karakterisasi senyawa dari fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* menggunakan LC-MS/MS dengan menggunakan kolom pemisahan C-18 (1.8µm 2.1 x 50 mm) (ACQUITY UPLC®BEH C18) dengan kecepatan alir 0,2 mL/menit. Kromatogram LC-MS/MS diolah menjadi bentuk mass array. Mass array adalah matriks data tiga dimensi yang mengandung informasi massa akurat dari puncak terdeteksi, waktu retensi, dan intensitas puncak. Kromatogram fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* (**Gambar 1**) terdapat beberapa puncak yang terdeteksi namun hanya ada satu peak pada puncak 2,69 yang terdeteksi berdasarkan massbank dan ion pragmenya.



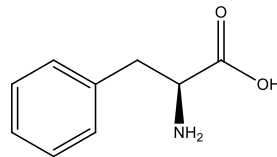
Gambar 1. Kromatogram dari fraksi etil asetat biji *B. macrophylla*

Puncak pada kromatogram terdeteksi 15 puncak dimana hanya terdeteksi pada waktu retensi 2,69 menit. Puncak lain tidak terdeteksi karena tidak ada data yang sama pada data base dan *online library*. Puncak pada waktu retensi 2,69 menit kemudian dianalisis dan diubah menjadi MS 1 dan MS 2 yang ditunjukkan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Data MS 1 dan MS 2 Waktu Retensi (2,69)

Data MS 1 dan MS 2 dari waktu retensi (2,69) diperoleh massa tunggal 120 (m/z). Berdasarkan data base dan *online library* (<https://massbank.eu/MassBank/Search>, <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/browse?query=&text=C8H10N4O2&size=10>, dan <http://www.chemspider.com/>) diperoleh formula $C_9H_{11}NO_2$ dengan senyawa yang disarankan adalah *phenylalanine* (Gambar 3).



Gambar 3. Struktur *phenylalanine*

Senyawa *phenylalanine* merupakan asam amino. Senyawa ini merupakan prekursor senyawa metabolit sekunder seperti senyawa-senyawa fenolik dan turunan. Senyawa golongan fenolik terbentuk dari turunan *phenylalanine* dengan menghilangkan gugus amin dan juga membutuhkan senyawa dari reaksi jalur asam malonat [15]. *Phenylalanine* dapat menaikkan aktivitas antioksidan, hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Szewczyk et al. (2021) yang menyatakan bahwa fenilalanin yang disuplementasikan pada sel kultur *Ginkgo biloba* L. dapat meningkatkan kandungan asam fenolik total secara signifikan dan meningkatkan aktivitas antioksidan [11]. Tingginya aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* disebabkan oleh senyawa flavonoid, fenolik dan kontribusi dari senyawa *phenylalanine*.

4. Kesimpulan

Fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 2,95 ppm. Fraksi etil asetat biji *B. macrophylla* mengandung senyawa flavonoid, fenolik, alkaloid dan *phenylalanine*.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Jenderal Pembelajaran dan Kemahasiswaan Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi RI atas bantuan dana penelitian melalui Program Kreativitas Mahasiswa skema Riset Eksakta (PKM-RE) tahun 2022.

Daftar Pustaka

- [1] Verrananda, I. M., Victoria, Y. F., Febrina, L., Rijai, L. (2016). "Identifikasi Metabolit Sekunder dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bunga Tapak Dara (*Catharanthus roseus*)."
(*Prosiding Seminar Kefarmasian Ke-4*), 20–21.
- [2] Handajani, A., Roosihermatie, B., & Maryani, H. (2010). "Faktor-Faktor yang Berhubungan dengan Pola Kematian pada Penyakit Degeneratif di Indonesia."
Jurnal Buletin Penelitian Sistem Kesehatan. 13(1), 42–45.

- [3] Rudiana, T., Suryani, N., Indriatmoko, D. D., Yusransyah, Amelia, A., Noviany, & Hadi, S. (2019). "Characterization of Antioxidative Fraction of Plant Stem *Bouea macrophylla* Griff." *Journal of Physics: Conference Series*, 1341(7). <https://doi.org/https://doi.org/10.1088/1742-6596/1341/7/072008>
- [4] Sitepu R., Nurdiani, R., & Rollando, R. (2020). "Aplikasi Metode Bioautografi dalam Penelusuran Daya Antibakteri Ekstrak Pegagan (*Centella Asiatica* (L.)." *Jurnal Katalisator*, 5(1), 32.
- [5] Rudiana, T., Herisman, D., Stiani, S. N., Yusransyah, Suryani, N., Yohanes, R., et al. (2021). "The Analysis of The Secondary Metabolite Compounds And Antioxidant Activity of Ethyl Acetate Extracts From The Stems of *Bouea macrophylla* griff." *AIP Conference Proceedings*, 2370(060015), 1–6. <https://doi.org/https://doi.org/10.1063/5.0062482>
- [6] Rudiana, T., Suryani, N., Indriatmoko, D.D., Yusransyah, Y., Hardiyanto, M.A., Yohanes, R., Hadi, S. (n.d.). "The Anticancer Activity Of Phytoconstituents Of The Stem Of *Bouea Macrophylla*." 14(December), 1955–1964.
- [7] Fathoni, A., Rudiana, T., & Adawiah. (2019). "Characterization and Antioxidant Assay of Yellow Frangipani Flower (*Plumeria alba*) Extract." *Jurnal Pendidikan Kimia*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/http://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/jpk>
- [8] Rudiana, T., Fitriyanti, F., & Adawiah, A. (2018). "Aktivitas Antioksidan dari Batang Gandaria (*Bouea macrophylla* griff)." *EduChemia*, 3(2), 195–205.
- [9] Hanifa, D., & Susilawati, Y. (15 C.E.). "Review Artikel: Potensi Tanaman Gandaria (*Bouea macrophylla* griff) Sebagai Obat Herbal yang Beraktivitas Antioksidan." *Farmaka*, 3, 143–42.
- [10] Angraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, A., Lisdiana., Nugrahaningsih, W. H., Habibah, N. A., & Bintari, S. H. (2018). *Metabolit Sekunder Dari Tanaman*. Semarang: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang.
- [11] Szweczyk, A., Kwiecień, I., Grabowski, M., Rajek, K., Cavò, E., Taviano, M. F., & Miceli, N. (2021). "Phenylalanine Increases The Production of Antioxidant Phenolic Acids in Ginkgo Biloba Cell Cultures." *Molecules*, 26(16). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26164965>
- [12] Indriani, V., Tobing, N. E. K. P., Rijai, L. (2018). "Formulasi Self-Nanoemulsifying Drug Delivery System (Snedds) Ekstrak Biji Ramania (*Bouea Macrophylla* Griff) dengan Asam Oleat (Oleic Acid) sebagai Minyak Pembawa." *Mulawrman Pharmaceutical Conference (November 2018)*; 20–21.
- [13] Verdiana, Melia, I Wayan Rai Widarta, I Dewa Gede, and M. P. (2018). "Gelombang Ultrasonik Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Buah Lemon (*Citrus Limon* (Linn .) *Burm F .*)." *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 7(4), 213–222.
- [14] Molyneux, P. (2004). The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl- Hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. 26(4), 211–219.
- [15] Lolean, L.A., Fatimawali, F. & Citraningtyas, G. (2013). "Uji Aktivitas Antioksidan Kandungan Fitokimia Jus Buah Gandaria (*Bouea macrophylla*)." *Pharmacon*, 2(2), 1–8.