



Antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of the seed of kesumba (*Bixa orellana* L.), ethyl-acetate of the turmeric fraction (*Curcuma longa* L.), and its combination

Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat biji kesumba (*Bixa orellana* L.), fraksi etil asetat kunyit (*Curcuma longa* L.), dan kombinasinya

Asniati Asniati, Winda Rahmalia, Endah Sayekti*

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Tanjungpura, Pontianak, Indonesia

*Corresponding author: endah.sayekti@chemistry.untan.ac.id

Abstract

Background: Antioxidants are compounds that can neutralize free radicals, so they can prevent degenerative diseases such as cardiovascular disease, carcinogenesis, and other diseases. Natural ingredients such as kesumba (*Bixa orellana* L.) seeds and turmeric (*Curcuma longa* L.) contain natural pigments that have antioxidant activity. Kesumba seeds contain bixin, and turmeric contains curcumin, each of which is an antioxidant compound that can protect cells in the body and prevent oxidative stress due to free radicals.

Objective: To determine the effect of the combination ratio of the ethyl acetate fraction of kesumba seeds and the ethyl acetate fraction of turmeric on antioxidant activity.

Method: Extraction was carried out by the maceration method, followed by fractionation. A qualitative test of the content of compounds in each extract and fraction of kesumba seeds and turmeric was carried out using the TLC method. The antioxidant activity test of each ethyl acetate fraction of kesumba seeds (FB) and ethyl acetate fraction of turmeric (FK) and their combination was carried out using the DPPH method.

Results: The research showed that each combination in the mass ratio of the ethyl acetate fraction of kesumba seeds (FB) to the ethyl acetate fraction of turmeric (FK) was 242.95, 65.78, 42.48, 108.81, and 51.46 mg/L for each of the mass ratios (1:0), (3:7), (1:1), (7:3), and (0:1). The combination ratio of FB:FK, which is 1:1, has an effect on increasing antioxidant activity. This combination provides a synergistic effect that can increase antioxidant activity, with an IC₅₀ value of 42.48 mg/L.

Conclusion: Based on the results of the study, it can be concluded that the combination of the ethyl acetate fraction of kesumba seeds (FB) and the ethyl acetate fraction of turmeric (FK) has an effect on increasing antioxidant activity in the ratio of FB:FK (1:1) with an IC₅₀ value of 42.48 mg/L, which is included in the very strong antioxidant category.

Keywords: Kesumba seeds, turmeric, bixin, curcumin, antioxidant

Intisari

Latar belakang: Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan radikal bebas sehingga mampu mencegah penyakit-penyakit degeneratif seperti kardiovaskuler, karsinogenesis dan penyakit lainnya. Bahan alam seperti biji kesumba (*Bixa orellana* L.) dan kunyit (*Curcuma longa* L.) mengandung pigmen alami yang memiliki aktivitas antioksidan. Biji kesumba mengandung bixin dan kunyit mengandung kurkumin yang masing-masing merupakan senyawa antioksidan sehingga mampu melindungi sel-sel dalam tubuh dan mencegah stress oksidatif yang diakibatkan oleh radikal bebas.

Tujuan: Untuk mengetahui pengaruh rasio kombinasi fraksi etil asetat biji kesumba dan fraksi etil asetat kunyit terhadap aktivitas antioksidan.

Metode: Ekstraksi menggunakan metode maserasi dan dilanjutkan dengan fraksinasi. Uji kualitatif kandungan senyawa dalam masing-masing ekstrak dan fraksi bixin dan kurkumin dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). Uji aktivitas antioksidan masing-masing fraksi etil asetat biji kesumba dan fraksi etil asetat kunyit serta kombinasinya dilakukan menggunakan metode DPPH.

Hasil: Hasil penelitian menunjukkan bahwa tiap kombinasi rasio massa fraksi etil asetat biji kesumba (FB);

fraksi etil asetat kunyit (1:0), (3:7), (1:1), (7:3) dan (0:1) memiliki aktivitas antioksidan berturut-turut sebesar 242,95; 65,78; 42,48; 108,81; dan 51,46 mg/L. Kombinasi tersebut memberikan efek sinergis yang dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 42,48 mg/L.

Kesimpulan: Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa pada kombinasi fraksi etil asetat biji kesumba (FB) dan fraksi etil asetat kunyit (FK) dengan rasio FB:FK (1:1) memberikan pengaruh pada peningkatan aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 42,48 mg/L yang termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat.

Kata kunci: Biji kesumba, kunyit, bixin, kurkumin, antioksidan

1. Pendahuluan

Antioksidan adalah senyawa yang penting dalam tubuh kita karena dapat menghambat radikal bebas. Radikal bebas merupakan senyawa yang sangat reaktif akibat adanya elektron yang tidak berpasangan pada kulit terluar sehingga menyebabkan terjadinya reaksi berantai secara terus menerus. Reaksi ini mengambil elektron yang terdapat pada sel normal untuk menstabilkan reaksi berantai dan menyebabkan kerusakan pada sel normal. Senyawa antioksidan dapat menghentikan reaksi berantai dengan cara mendonorkan satu elektronnya pada radikal bebas yang tidak stabil sehingga elektron terluarnya menjadi berpasangan dan menjadi stabil (Rahmi, 2017).

Senyawa antioksidan dapat bersumber dari bahan alam seperti tanaman kesumba (*Bixa orellana* L.). Biji kesumba berwarna merah karena mengandung pigmen alami dari golongan apokarotenoid bixin dan norbixin. Warna *orange* kemerahan pada biji kesumba disebabkan bixin memiliki sembilan ikatan rangkap terkonjugasi yang disebut kromofor (Rahmalia & Naselia, 2021). Pigmen bixin berkaitan erat dengan aktivitas antioksidannya. Menurut Kurniawati *et al.* (2007) pigmen bixin memiliki sifat antioksidan yang bisa menetralkan radikal bebas berlebihan namun aktivitasnya sangat lemah dengan nilai IC_{50} sebesar 548 mg/L.

Selain kesumba, tanaman kunyit (*Curcuma longa* L.) juga termasuk tanaman tropis yang banyak terdapat di Indonesia (Ar Rahmah, 2019). Kunyit mengandung kurkuminoid utama yaitu kurkumin dan dua turunan demetoksikurkumin dan bisdemetoksikurkumin yang memiliki berbagai aktivitas termasuk antioksidan. Kurkumin merupakan senyawa polifenol dengan rumus kimia $C_{12}H_{20}O_6$ yang merupakan kelompok senyawa antioksidan alami yang dapat menangkal radikal bebas dan berperan sebagai donor hidrogen (Abdurrahman, 2019). Uji aktivitas antioksidan kurkumin yang dilakukan oleh Wahyuningtyas *et al.* (2017) menghasilkan nilai IC_{50} sebesar 51,17 mg/L.

Riaminanti *et al.* (2016) melaporkan bahwa kapasitas antioksidan (mg GAEC/100 mg ekstrak) dari ekstrak kunyit dan ekstrak asam masing-masing sebesar 3,73% dan 1,43%. Setelah ekstrak kunyit dan ekstrak daun asam dicampur dengan rasio 55:45 menghasilkan kapasitas antioksidan (mg GAEC/100 mg ekstrak) sebesar 4,844%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa terjadi sinergisme terhadap meningkatnya kapasitas antioksidan ketika ekstrak kunyit dan ekstrak daun

asam dicampur pada rasio tertentu. Dalam penelitian ini, dilakukan uji aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat biji kesumba, fraksi etil asetat kunyit, serta kombinasi keduanya untuk mengetahui pengaruh rasio kombinasi keduanya terhadap sifat aktivitas antioksidan.

2. Metode

2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu aluminium foil, ayakan 80 *mesh*, gelas beker, blender, batang pengaduk, *bulb*, corong pisah, cawan petri, *chamber* KLT, *hot plate*, kaca arloji, kertas saring, kertas label, labu ukur, neraca analitik, pipet volume, pipet tetes, pisau, plat KLT silica gel₆₀ F₂₅₄, rak tabung reaksi, *rotary evaporator*, saringan, spatula, tabung reaksi, *wrapping* dan spektrofotometer UV-Vis (*Shimadzu UV 2600*).

2.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akuades, aseton (Smart-Lab), etanol (Supelco), biji kesumba yang diperoleh dari Pontianak Kalimantan Barat, DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) (Himedia), Diklorometana (Supelco), etil asetat (Full time), kunyit, klorofom (Supelco), metanol (Supelco) dan *n*-heksana (Fulltime).

2.3. Preparasi sampel biji kesumba

Preparasi biji kesumba pada penelitian ini mengadopsi metode Naselia *et al.* (2020) yang telah dimodifikasi. Biji kesumba dipisahkan dari kulit buahnya dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama 7 jam.

2.4. Preparasi sampel kunyit

Preparasi sampel kunyit pada penelitian ini mengadopsi metode Christina *et al.* (2018) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 2 kg kunyit dicuci dengan air mengalir untuk membuang pengotor seperti tanah, pasir, dan sebagainya hingga bersih lalu ditiriskan. Kemudian rimpang kunyit dipotong-potong menjadi bagian yang lebih kecil sekitar 1 mm. Kunyit yang sudah diiris kemudian dilakukan proses pengeringan menggunakan oven pada suhu 55°C selama 5 jam. Setelah sampel kering lalu dihaluskan dengan menggunakan *blender*. Setelah itu disaring dengan menggunakan saringan 60 *mesh* sehingga menjadi bubuk kunyit.

2.5 Ekstraksi bixin

Ekstraksi bixin dari biji kesumba pada penelitian ini mengadopsi metode Rahmalia *et al.* (2021) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 100 g biji kesumba kering direndam dalam 200 mL etil asetat dalam gelas *beaker*, diaduk selama 1 jam dan disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan biji kesumba setelah proses ekstraksi. Proses tersebut diulangi sampai semua warna terekstraksi kedalam pelarut etil asetat, kemudian ekstrak etil asetat biji kesumba dilakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat biji kesumba. Selanjutnya terhadap ekstrak kental tersebut dilakukan partisi menggunakan *n*-heksana, endapan yang terbentuk disaring lalu dilarutkan dalam metanol. Endapan yang tidak larut dalam metanol kemudian disaring lalu dilarutkan ke dalam etil asetat (selanjutnya disebut dengan fraksi etil asetat biji kesumba, FB). FB diuapkan lalu ditimbang dan dihitung rendemennya.

2.6 Ekstraksi kurkumin

Ekstraksi senyawa aktif dari kunyit pada penelitian ini mengadopsi metode Christina *et al.* (2018) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 100 g sampel bubuk kunyit dilakukan maserasi dalam 200 mL etanol selama 24 jam dengan pengadukan setiap 12 jam sekali. Setelah 24 jam, larutan disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1. Berikutnya ke dalam sampel ditambahkan lagi dengan pelarut etanol, setelah 24 jam lalu disaring menggunakan kertas saring Whatman No.1. Larutan hasil penyaringan (filtrat) diuapkan menggunakan *rotary evaporator*. Setelah itu ekstrak etanol dipartisi menggunakan *n*-heksana, endapan yang terbentuk disaring lalu dilarutkan menggunakan etanol. Selanjutnya endapan yang tersisa setelah penambahan metanol disaring lalu dilarutkan menggunakan etil asetat (selanjutnya disebut dengan fraksi etil asetat kunyit, FK). FK diuapkan pada suhu 40°C menggunakan *rotary evaporator*, dilanjutkan pengeringan menggunakan gas N₂. Setelah itu FK yang dihasilkan ditimbang dan dihitung rendemennya.

2.7 Pembuatan larutan kombinasi bixin dan kurkumin

Pembuatan larutan sampel kombinasi FB dan FK mengadopsi metode Septiawan *et al.* (2020) yang telah dimodifikasi. Kombinasi tersebut dibuat dengan menyiapkan larutan induk terlebih dahulu dengan cara menimbang masing-masing FB dan FK sebanyak 50 mg secara terpisah, kemudian dilarutkan dalam etanol absolut menggunakan labu ukur 100 mL dan ditepatkan hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan induk FB dan FK masing-masing dengan konsentrasi larutan sebesar 500 mg/L. Setelah itu, pembuatan larutan kombinasi FB:FK dengan variasi rasio 1:0, 7:3, 1:1,

3:7 dan 0:1 (v/v) dilakukan dengan mengencerkan larutan induk dari 500 mg/L menjadi 50 mg/L, dimana tiap variasi rasio larutan tersebut diambil dengan total volume larutan sebanyak 5 mL untuk mendapatkan konsentrasi larutan sebesar 50 mg/L. Pembuatan larutan sampel untuk variasi rasio FB:FK (1:0) dibuat dengan mengambil larutan induk FB sebanyak 5 mL; untuk variasi (7:3) dibuat dengan mengambil larutan induk FB sebanyak 3,5 mL dan larutan induk FK 1,5 mL; variasi (1:1) dibuat dengan cara mengambil larutan induk FB dan FK masing-masing sebanyak 2,5 mL; dan variasi (3:7) dibuat dengan cara mengambil larutan induk FB sebanyak 1,5 mL dan larutan induk FK 3,5 mL dan variasi (0:1) dibuat dengan cara mengambil larutan induk FK sebanyak 5 mL, lalu setiap variasi rasio dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL dan ditepatkan menggunakan etanol absolut, sehingga diperoleh konsentrasi larutan tiap variasi rasio sebesar 50 mg/L.

2.8 Uji aktivitas antioksidan

2.8.1 Pembuatan larutan stok DPPH 40 mg/L

Pembuatan larutan stok mengadopsi metode Adrianta (2020) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 2 mg DPPH dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL kemudian ditambahkan etanol absolut hingga tanda batas dikocok hingga homogen.

2.8.2 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

Penentuan panjang gelombang maksimum mengadopsi metode Adrianta (2020). Larutan baku DPPH 40 mg/L dipipet sebanyak 2 mL dan ditambahkan 2 mL pelarut etanol absolut, dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok hingga homogen ditutup dengan aluminium foil dalam ruangan gelap selama 30 menit. Setelah itu dituang ke dalam kuvet kemudian diukur pada panjang gelombang 400-600 nm.

2.8.3 Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas DPPH

Pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas DPPH mengadopsi metode Adrianta (2020). Larutan kombinasi FB:FK (1:0), (7:3), (1:1), (3:7) dan (0:1) dengan konsentrasi larutan 50 mg/L, diencerkan menjadi seri konsentrasi 4, 6, 8, 10 dan 12 mg/L. Pembuatan seri konsentrasi dilakukan dengan mengambil larutan tiap kombinasi FB:FK (1:0), (7:3), (1:1), (3:7) dan (0:1) masing-masing sebanyak 2, 3, 4, 5, dan 6 mL lalu dimasukkan masing-masing ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan etanol absolut hingga tanda batas.

Preparasi larutan untuk pengukuran aktivitas peredaman radikal bebas. Larutan kombinasi FB:FK (1:0), (7:3), (1:1), (3:7) dan (0:1) dengan konsentrasi 4, 6, 8, 10 dan 12 mg/L, masing-masing diambil sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berbeda, lalu ditambahkan 2 mL

larutan DPPH 40 mg/L. Pengukuran larutan blanko dilakukan dengan cara mengambil larutan DPPH 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan 2 mL pelarut etanol absolut. Setelah itu, seluruh tabung reaksi dikocok dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit di tempat gelap. Setelah itu, masing-masing larutan diamati absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan seluruh hasil yang diperoleh dicatat. Perlakuan sampel uji masing-masing konsentrasi dilakukan secara *triplo*.

2.9 Perhitungan parameter uji antioksidan

Persentase aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1 difenil-2-pikrilhidrazil) dinyatakan dalam bentuk persentase peredaman, dapat dihitung dengan persamaan berikut (Souhoka *et al.*, 2019):

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\%$$

Keterangan:

A₀ = Absorbansi kontrol (tanpa sampel)

A_t = Absorbansi sampel uji

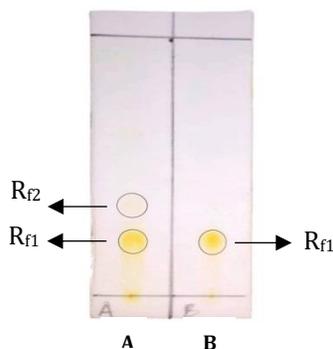
Konsentrasi antara persen peredaman dengan konsentrasi sampel uji diplotkan dan nilai IC₅₀ dihitung dari persamaan regresi linier $y = ax + b$, dimana y sebesar 50 dan x sebagai nilai IC₅₀. Parameter yang digunakan untuk uji peredaman radikal bebas DPPH adalah nilai IC₅₀ yang merupakan konsentrasi sampel uji yang dibutuhkan untuk menghambat radikal DPPH sebesar 50%, semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya.

3. Hasil dan pembahasan

3.1. Ekstraksi bixin

Ekstraksi senyawa aktif dari biji kesumba dilakukan menggunakan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat karena sifat kandungan utama dari biji kesumba yaitu bixin dapat larut baik dalam pelarut etil asetat dibandingkan dengan pelarut lainnya. Struktur bixin yang terdiri dari rantai poliena dan memiliki gugus karboksilat serta metil ester yang menyebabkan bixin memiliki afinitas yang lebih besar pada pelarut semi polar (Rahmalia *et al.*, 2014). Hasil rendemen ekstrak kasar biji kesumba yang diperoleh adalah sebesar 3,019% dari berat kering biji kesumba 100 gram. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan partisi dengan melarutkan ekstrak ke dalam pelarut *n*-heksana dan metanol (Maharani *et al.*, 2022).

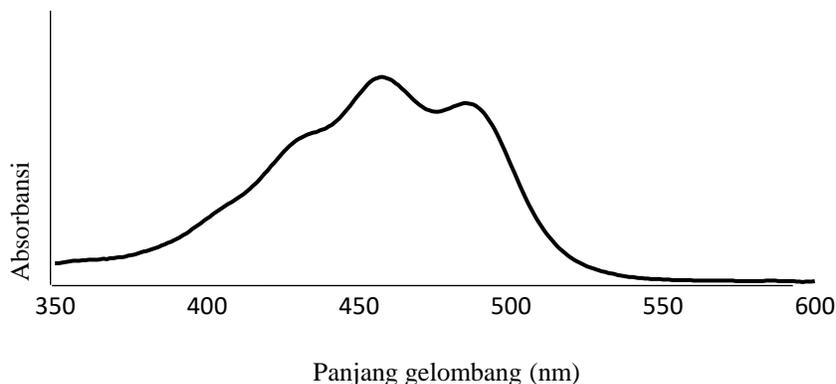
Ekstrak etil asetat biji kesumba dan fraksi etil asetat biji kesumba (FB) yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan metode KLT yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak biji kesumba. Prinsip KLT adalah distribusi senyawa antara fase diam (padat) yang diterapkan pada kaca atau pelat plastik dan fase gerak cair (pelarut elusi) yang bergerak melalui fase diam. Fase gerak adalah pelarut yang dipilih sesuai dengan sifat-sifat komponen dalam campuran (Kumar *et al.*, 2013). Analisis KLT ini dilakukan menggunakan eluen *n*-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (6:4), dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil KLT A) ekstrak EA, B) fraksi EA dari biji kesumba (FB) dalam eluen *n*-heksana:etil asetat (6:4) dengan fase diam silika gel

Berdasarkan Gambar 1, ekstrak EA biji kesumba menghasilkan dua *spot* dengan nilai R_{f1} 0,26 yang diduga senyawa bixin dan nilai R_{f2} 0,38 adalah senyawa selain bixin, sedangkan pada fraksi EA dari biji kesumba (FB) menunjukkan hanya satu *spot* yang diduga senyawa bixin dengan nilai R_{f1} sebesar 0,26. Nilai R_{f1} yang diperoleh mendekati nilai R_f bixin standar yang dihasilkan oleh Albuquerque *et al.* (2015) yaitu sebesar 0,27.

Analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dilakukan untuk mengetahui karakteristik daerah serapan fraksi EA dari biji kesumba yang diduga merupakan daerah serapan bixin. Analisis dilakukan dengan melarutkan sedikit fraksi EA biji kesumba (FB) ke dalam pelarut etanol lalu dilakukan *scanning* pada rentang panjang gelombang 300-600 nm. Spektrum UV-Vis fraksi EA biji kesumba (FB) dapat dilihat pada Gambar 2.

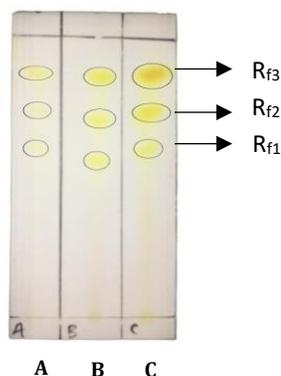


Gambar 2. Spektra UV-Vis fraksi EA biji kesumba (FB) dalam pelarut etanol

Berdasarkan Gambar 2 dapat diamati bahwa fraksi EA biji kesumba (FB) memiliki karakteristik tiga puncak serapan maksimum pada panjang gelombang 485, 457, dan 428 nm. Karakteristik ini tidak jauh berbeda dengan pengukuran bixin yang muncul 3 puncak pada panjang gelombang 486, 458, dan 432 nm dalam pelarut etanol (Kumar, 2005). Absorbansi yang terjadi pada daerah panjang gelombang di atas 400 nm menunjukkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi pada senyawa bixin. Puncak yang muncul pada panjang gelombang 485 dan 457 nm menunjukkan adanya transisi elektron dari π ke π^* yang dihasilkan dari ikatan terkonjugasi C=C, sedangkan puncak yang muncul pada panjang gelombang 428 nm, karena adanya transisi elektron dari n ke π^* yang dihasilkan oleh gugus karbonil C=O (Maharani *et al.*, 2022).

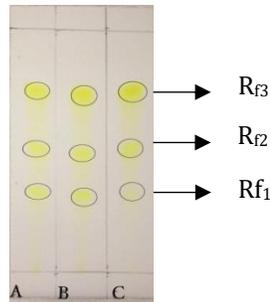
3.2. Ekstraksi kurkumin

Ekstraksi senyawa aktif dari kunyit pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol. Senyawa kurkuminoid merupakan senyawa yang bersifat polar disebabkan adanya gugus -OH. Kurkuminoid larut dalam pelarut-pelarut yang memiliki kepolaran hampir sama. Etanol merupakan pelarut yang memiliki kepolaran mirip dengan kurkuminoid sehingga digunakan untuk mengekstrak kurkuminoid (Himawan *et al.*, 2012). Hasil rendemen ekstrak kunyit yang diperoleh adalah sebesar 33,802%.



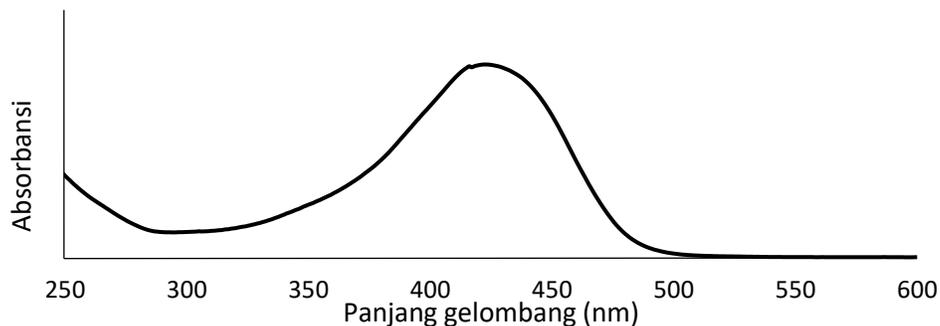
Gambar 3. Hasil KLT A) ekstrak kunyit, B) fraksi EA kunyit (FK) dan C) kurkumin standar dalam eluen klorofom:metanol (95:5)

Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan partisi dengan melarutkan ekstrak ke dalam pelarut *n*-heksana. Tujuannya adalah untuk melarutkan senyawa selain bixin, senyawa yang bersifat non-polar dari ekstrak. Endapan yang terbentuk pada proses ini menunjukkan bahwa senyawa target dalam ekstrak biji kesumba tidak larut dalam pelarut non-polar, namun larut dalam semi polar. Setelah itu, larutan disaring untuk memisahkan ekstrak *n*-heksana dan fraksi etil asetat (EA). Fraksi yang terdapat pada kertas saring, kemudian diambil dan dilarutkan kembali dalam pelarut metanol. Tujuannya adalah untuk melarutkan senyawa polar selain bixin yang masih ada dalam ekstrak kemudian larutan disaring kembali dengan kertas saring untuk memisahkan fraksi EA dan fraksi metanol. Hasil saringan sebelumnya diambil dan dibilas kembali menggunakan pelarut etil asetat yang bertujuan untuk mendapatkan ekstrak yang hanya mengandung senyawa bixin. Fraksi EA yang dihasilkan kemudian dikeringkan untuk menghilangkan pelarutnya (Maharani *et al.*, 2022). Ekstrak dan fraksi EA kunyit yang diperoleh kemudian dianalisis dengan metode KLT yang bertujuan untuk mengetahui komponen kimia yang terdapat pada ekstrak dan fraksi kunyit seperti pada Gambar 3. Berdasarkan Gambar 3, ekstrak kunyit dan fraksi EA kunyit (FK) masing-masing menghasilkan tiga *spot* pemisahan dengan nilai R_{f1} 0,62, R_{f2} 0,76 dan R_{f3} 0,92 untuk ekstrak kunyit, sedangkan fraksi EA kunyit (FK) dengan nilai R_{f1} 0,60, R_{f2} 0,72, R_{f3} 0,88. Nilai R_f masing-masing ekstrak kunyit dan fraksi EA kunyit (FK) yang dihasilkan mendekati nilai R_f kurkumin standar yaitu R_{f1} 0,62, R_{f2} 0,76 dan R_{f3} 0,90. Hasil dari tiga *spot* pemisahan yang dihasilkan secara berurutan diidentifikasi sebagai bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin (Suharsanti *et al.*, 2020).



Gambar 4. Hasil KLT (A) Ekstrak kunyit (B) Fraksi EA kunyit (FK) dan (C) kurkuminoid standar dalam eluen diklorometana:etanol (95:5)

Hasil identifikasi kurkumin dengan KLT terhadap ekstrak EA kunyit dan fraksi EA kunyit (FK) menggunakan eluen yang berbeda yaitu diklorometana:etanol (95:5) (pada Gambar 3) juga menghasilkan tiga *spot* pemisahan pada masing-masing ekstrak kunyit dan fraksi EA kunyit (FK). Ekstrak EA kunyit menghasilkan nilai R_{f1} sebesar 0,34, R_{f2} 0,52 dan R_{f3} 0,78, sedangkan pada fraksi EA kunyit menghasilkan nilai R_{f1} sebesar 0,32, R_{f2} 0,50 dan R_{f3} 0,76. Fraksi EA kunyit (FK) mendekati nilai R_f kurkuminoid standar dengan nilai R_{f1} 0,34, R_{f2} 0,52 dan R_{f3} 0,78. Berdasarkan hasil yang diperoleh dengan eluen yang berbeda dihasilkan tiga *spot* pemisahan, maka ekstrak kunyit dan fraksi EA kunyit (FK) dapat diidentifikasi sebagai bisdemetoksikurkumin, demetoksikurkumin dan kurkumin. Fraksi EA kunyit (FK) dalam pelarut etanol, dilakukan *scanning* dengan spektrofotometer UV-Vis pada rentang panjang gelombang 300-600 nm dapat dilihat pada Gambar 5.



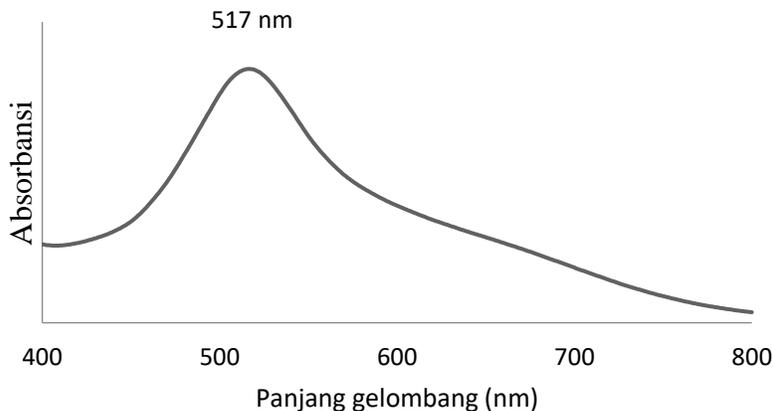
Gambar 5. Spektra UV-Vis fraksi EA kunyit (FK) dalam pelarut etanol

Hasil analisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa fraksi EA kunyit (FK) memiliki panjang gelombang maksimum pada 423 nm. Hasil yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan panjang gelombang maksimum kurkumin yaitu pada panjang gelombang 421 nm (Van Nong *et al.*, 2016).

3.4. Uji aktivitas antioksidan bixin dan kurkumin serta kombinasinya

Pengujian aktivitas antioksidan FB, FK dan kombinasinya dilakukan dengan metode DPPH (difenil pikrihidrazil) menggunakan spektrofotometer UV-Vis. DPPH merupakan radikal bebas yang stabil pada suhu ruang. Penentuan panjang gelombang maksimum larutan DPPH dilakukan dengan cara mengukur serapan absorbansi larutan DPPH 40 mg/L yang telah dibuat larutan berwarna ungu, diambil dengan pipet sebanyak 2 mL larutan DPPH dan 2 mL larutan etanol absolut lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok hingga homogen, kemudian dilakukan *scanning* pada rentang panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Berdasarkan Gambar 6, spektra UV-Vis larutan DPPH memiliki λ maks 517 nm, sehingga panjang gelombang tersebut akan digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel. Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian Handayany *et al.* (2018) bahwa DPPH memberikan serapan kuat pada panjang gelombang 517 nm dengan warna violet yang gelap. Menurut Septiawan *et al.* (2020), panjang gelombang maksimum DPPH berkisar antara 515-522 nm. Senyawa bixin dari biji kesumba merupakan zat warna yang termasuk dalam golongan karotenoid memiliki aktivitas antioksidan, sehingga berpotensi dalam menetralsir radikal bebas (Souhoka *et al.*, 2019).



Gambar 6. Spektra UV-Vis larutan DPPH

Selain itu, kurkumin dari ekstrak kunyit termasuk golongan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan sehingga dapat menangkal radikal bebas karena mengandung gugus hidroksil yang melekat pada dua cincin aromatik. Gugus hidroksil pada isomer keto dan enol berperan dalam aktivitas antioksidan yang diduga mampu mengurangi dua radikal bebas karena gugus O-H fenolik bersifat labil, sehingga atom H mudah untuk didonorkan pada radikal bebas (Barzegar, 2012).

Tabel 1. Hasil perhitungan % inhibisi FB, FK dan kombinasinya

Sampel	Konsentrasi (mg/L)				
	% Inhibisi				
	4	6	8	10	12
FB:FK (1:0)	14,387	14,465	14,858	15,369	15,448
FB:FK (7:3)	1,340	3,485	4,915	6,792	7,507
FB:FK (1:1)	3,687	6,391	8,702	11,013	13,373
FB:FK (3:7)	1,348	3,356	4,647	4,876	5,163
FB:FK (0:1)	8,277	10,746	12,204	13,195	15,786

Hasil pada Tabel 1, menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi larutan uji, maka semakin meningkat persen inhibisi. Hal ini karena semakin banyak atom hidrogen dari senyawa bixin dan kurkumin yang berpasangan dengan elektron radikal bebas DPPH. Menurut Septiawan *et al.* (2020) bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi persen inhibisi yang dihasilkan. Hal ini juga sesuai dengan pernyataan dalam penelitian Rikantara *et al.* (2022) bahwa semakin tinggi konsentrasi sampel, maka semakin besar kemampuan sampel dalam menangkal radikal bebas karena banyak atom hidrogen yang didonorkan oleh senyawa metabolit sekunder pada senyawa DPPH sehingga semakin banyak juga reduksi yang dapat dilakukan terhadap DPPH.

Persen inhibisi yang dihasilkan kemudian diplot dengan konsentrasi sampel uji untuk menghasilkan grafik dengan persamaan regresi linier yang digunakan untuk mencari nilai IC_{50} yaitu konsentrasi senyawa sampel yang dapat menangkal radikal bebas sebesar 50%. Hasil persamaan regresi linier ($y=ax+b$) dan IC_{50} diperoleh setelah menghitung persen inhibisi untuk tiap variasi FB dan FK beserta kombinasinya, dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil persamaan regresi linier dan nilai IC_{50} FB, FK dan kombinasinya

Sampel	Persamaan Regresi linier	IC_{50} (mg/L)
FB:FK (1:0)	$y = 0,1494x + 13,703$ $R^2 = 0,9498$	242,95
FB:FK (7:3)	$y = 0,7821x - 1,4486$ $R^2 = 0,9782$	65,78
FB:FK (1:1)	$y = 1,1996x - 0,9636$ $R^2 = 0,999$	42,48
FB:FK (3:7)	$y = 0,4575x + 0,218$ $R^2 = 0,8447$	108,81
FB:FK (0:1)	$y = 0,8734x + 5,0548$ $R^2 = 0,977$	51,46

Nilai IC_{50} yang dihasilkan memiliki arti bahwa pada konsentrasi tersebut sampel uji yang digunakan dapat meredam 50% dari DPPH (Apriliani & Tukiran, 2021). Berdasarkan hasil pada Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai IC_{50} yang dihasilkan dari kombinasi FB:FK pada rasio (1:0) adalah sebesar 242,95 mg/L termasuk kategori antioksidan sedang karena berada pada rentang 100-250 mg/L (Putri & Hidajati, 2015). Hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian Kurniawati

et al. (2007) yang menyatakan bahwa nilai IC_{50} dari ekstrak biji kesumba dalam metanol adalah sebesar 548 mg/L, namun lebih rendah jika dibandingkan dengan penelitian Souhoka *et al.* (2019) dimana diperoleh IC_{50} ekstrak biji kesumba dalam metanol sebesar 69,425 mg/L.

Hasil ini menunjukkan bahwa pelarut sangat berpengaruh terhadap aktivitas antioksidan (Firdiyani *et al.*, 2015). Adanya perbedaan nilai IC_{50} yang dihasilkan tersebut juga dapat disebabkan oleh faktor pelarut yang digunakan saat ekstraksi berbeda. Pelarut yang digunakan saat proses ekstraksi berpengaruh terhadap konsentrasi senyawa bioaktif seperti antioksidan. Hal ini sesuai dengan pernyataan (Dawidowicz & Olszowy, 2012) bahwa aktivitas antioksidan dalam menangkal/meredam radikal DPPH dapat bervariasi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan untuk ekstraksi berdasarkan polaritas pelarut.

Faktor lain yang dapat mempengaruhi perbedaan hasil tersebut karena faktor geografis, faktor genetik, kondisi iklim, asal benih dan tingkat kesuburan tanah yang mempengaruhi kandungan senyawa dalam tanaman (Apriliani & Tukiran, 2021). Kombinasi FB:FK pada rasio (0 :1) memiliki nilai IC_{50} sebesar 51,46 mg/L dan termasuk dalam kategori kuat karena pada rentang 50-100 mg/L (Putri & Hidajati, 2015). Hasil yang diperoleh sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahyuningtyas *et al.* (2017) yaitu aktivitas antioksidan kurkumin dari ekstrak kunyit yang diperoleh dalam pelarut etanol adalah sebesar 51,17 mg/L yang termasuk dalam kategori antioksidan kuat.

Hasil pengujian kombinasi FB:FK (1:1) memiliki potensi antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 42,48 mg/L dan termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan sangat kuat karena berada pada rentang dibawah 50 mg/L (Putri & Hidajati, 2015). Kombinasi FB:FK (7:3) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 65,78 mg/L yang termasuk dalam kategori aktivitas antioksidan kuat, karena berada pada rentang antara 50-100 mg/L (Putri & Hidajati, 2015). Kombinasi FB: FK (3:7) juga memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 108,81 mg/L, namun kekuatan antioksidan termasuk dalam kategori sedang karena berada pada rentang 100-250 mg/L (Putri & Hidajati, 2015).

Kombinasi FB:FK (0:1) menghasilkan nilai IC_{50} lebih kecil dibandingkan dengan FB:FK (1:0) yang menandakan bahwa senyawa kurkumin di dalam fraksi etil asetat kunyit (FK) lebih dominan dalam menangkal radikal bebas daripada bixin di dalam fraksi etil asetat biji kesumba (FB). Semakin kecil nilai IC_{50} yang diperoleh maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Zuliani *et al.*, 2019). Perbedaan hasil ini berdasarkan senyawa dan gugus fungsi yang melekat berbeda, sehingga aktivitas antioksidan yang dihasilkan berbeda. Hal ini juga dikarenakan kurkumin merupakan senyawa polifenol yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dengan dua cincin benzena

yang masing-masing memiliki gugus hidroksil (OH) dan gugus metoksi (OCH₃) secara simetris (Agnihotri & Mishra, 2011). Dalam molekul kurkumin, gugus OH fenolik yang berperan penting dalam aktivitas antioksidan, dimana gugus OH fenolik akan mendonorkan atom H, sehingga senyawa DPPH akan tereduksi menjadi senyawa non-radikal yang stabil menjadi DPPH-H (Apriliani & Tukiran, 2021).

Oleh karena itu, kurkumin memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi karena memiliki dua gugus hidroksil yang melekat pada cincin aromatik sehingga kemampuan dalam menangkal radikal bebas lebih besar dari bixin. Hal ini juga diperkuat oleh penelitian Del Prado-Audelo *et al.* (2019) yang berhubungan dengan aktivitas antioksidan, menunjukkan bukti bahwa kurkumin dapat menangkal radikal bebas secara langsung oleh kedua bagian fenoliknya. Berdasarkan hasil nilai IC₅₀ yang diperoleh menunjukkan bahwa kombinasi FB:FK pada variasi rasio (1:1) memberikan efek sinergisme bila dikombinasikan, yang artinya penggunaan kedua pigmen tersebut secara bersamaan dengan perbandingan tersebut dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dari masing-masing pigmen yang dikombinasi dengan nilai IC₅₀ yang dihasilkan adalah sebesar 42,48 mg/L yang termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat. Menurut Riaminanti *et al.* (2016) sinergisme dapat terjadi ketika campuran dari antioksidan dengan tegas memperlihatkan peningkatan aktivitas antioksidan melebihi dari aktivitas antioksidan ekstrak tunggal.

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan dari kombinasi fraksi etil asetat biji kesumba (FB) dan fraksi etil asetat kunyit (FK) pada variasi (1 :1) memberikan pengaruh terhadap peningkatan aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ yang dihasilkan sebesar 42,48 mg/L dan termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat.

Ucapan terimakasih

Terima kasih kepada Kepala Laboratorium kimia dan Kepala UPT Laboratorium Terpadu Universitas Tanjungpura atas layanan dan penyediaan fasilitas laboratorium.

Daftar Pustaka

- Abdurrahman, N. (2019). Kurkumin Pada *Curcuma longa* Sebagai Tatalaksana Alternatif Kanker. *Jurnal Agromedicine*, 6(2), 410–415.
- Adrianta, K.A. (2020). Aktivitas Antioksidan Daun Magenta (*Peristrophe bivalvis* (L.) Merr) Sebagai Salah Satu Kandidat Pengobatan Bahan Berbasis Herbal Serta Bioaktivitasnya Sebagai Analgetik. *Jurnal Ilmiah Medicamento*, 6(1), 33–39. <https://doi.org/10.36733/medicamento.v6i1.745>
- Agnihotri, N., & Mishra, P.C. (2011). Scavenging Mechanism of Curcumin Toward the Hydroxyl

- Radical: A Theoretical Study of Reactions Producing Ferulic Acid and Vanillin. *Journal Physical Chemistry*, 115, 14221–14232. <https://doi.org/10.1021/jp209318f>
- Albuquerque, C.L.C., L. Santana, Á., & Meireles, M. Angela A. (2015). Thin Layer Chromatographic Analysis of Annatto Extracts Obtained Using Supercritical Fluid. *Food and Public Health*, 5(4), 127–137. <https://doi.org/10.5923/j.fph.20150504.05>
- Apriliani, N. T., & Tukiran. (2021). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kejibeling (*Strobilanthes crispus* L., Blume) dan Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata* Burm. f. Nees) dan Kombinasinya. *Jurnal Kimia Riset*, 6(1), 68–76. <https://doi.org/10.20473/jkr.v6i1.26634>
- Ar Rahmah, A.H. (2019). Efektivitas Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica*) Terhadap Penurunan Risiko Aterosklerosis. *Prev. Jurnal kesehatan Masyarakat*, 10(2), 113–120.
- Barzegar, A. (2012). The Role of Electron-Transfer and H-atom Donation On The Superb Antioxidant Activity and Free Radical Reaction of Curcumin. *Journal Food Chemistry*, 135(2012), 1369–1376. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.070>
- Christina, I.A.M., Kencana, I.N., & Permana, I.D.G.M. (2018). Pengaruh Metode Pengeringan dan Jenis Pelarut terhadap Rendemen dan Kadar Kurkumin Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica* Val). *Jurnal Ilmiah Teknologi Pertanian Agrotechno*, 3(1), 319–324. <https://doi.org/10.24843/jitpa.2018.v03.i02.p02>
- Dawidowicz, A.L., & Olszowy, M. (2012). Mechanism Change In Estimating of Antioxidant Activity of Phenolic Compounds. *Journal Talanta*, 97, 312–317. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.04.036>
- Del Prado-Audelo, M.L., Caballero-Florán, I.H., Meza-Toledo, J.A., Mendoza-Muñoz, N., González-Torres, M., Florán, B., Cortés, H., & Leyva-Gómez, G. (2019). Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. *Journal Biomolecules*, 9(56), 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom9020056>
- Firdiyani, F., Agustini, T.W., & Ma'ruf, W.F. (2015). Ekstraksi Senyawa Bioaktif sebagai Antioksidan Alami Spirulina Platensis Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 18(1), 28–37. <https://doi.org/10.17844/jphpi.2015.18.1.28>
- Handayani, G.N., Umar, I., & Ismail, I. (2018). Formulasi Dan Uji Efektivitas Antioksidan Krim Ekstrak Etanol Daun Botto'-Botto' (*Chromolaena odorata* L.) Dengan Metode DPPH. *Jurnal Kesehatan*, 11(2), 86–90. <https://doi.org/10.24252/kesehatan.v11i2.5944>
- Himawan, H.C., Surjana, V., & Prawira, L. (2012). Karakterisasi Dan Identifikasi Komponen Kimia Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica* Val.) Sebagai Inhibitor Bakteri Patogen. *Fitofarmaka*, 2(2), 116–125.
- Kumar, S. (2005). *Biodiversity & Conservation*. APH Publishing Corporation, Inggris.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., & Sarangi, M. (2013). Thin Layer Chromatography : A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1), 126–132.
- Kurniawati, P., Soetjipto, H., & Limantara, L. (2007). Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Pigmen Bixin Selaput Biji Kesumba (*Bixa orellana* L.). *Indonesian Journal of Chemistry*, 7(1), 88–92.
- Maharani, A.B., Destiarti, L., & Rahmalia, W. (2022). The Effect of Cell Surface Area on the Effectivity and Reusability of Bixin Sensitized Solar Cells. *Journal Positron*, 12(1), 39–48. <https://doi.org/10.26418/positron.v12i1.53409>
- Naselia, U.A., Septiani, Silalahi, I.H., & Rahmalia, W. (2020). Isolasi dan Karakterisasi Pigmen Bixin dari Tanaman Kesumba (*Bixa orellana* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 8(3), 53–61.
- Putri, A.A.S., & Hidajati, N. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Metanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccensis*). *UNESA Journal of Chemistry*, 4(1), 37–42.
- Rahmalia, W., Fabre, J.F., Usman, T., & Mouloungui, Z. (2014). Aprotic Solvents Effect On The UV-visible Absorption Spectra of Bixin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular*

- Spectroscopy*, 131(2014), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.03.119>
- Rahmalia, W., & Naselia, U.A. (2021). Transition Energy, Spectral Fine Structure, and Absorption Coefficient of Norbixin (9'-cis-6,6'-diapocarotene-6,6'dioic acid) in Different Polar Solvents. *Journal of Physics: Conference Series*, 1751(2021), 1–10. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1751/1/012085>
- Rahmalia, W., Septiani, Naselia, U.A., Usman, T., Silalahi, I.H., & Mouloungui, Z. (2021). Performance Improvements of Bixin and Metal-Bixin Complexes Sensitized Solar Cells by 1-Methyl-3-propylimidazolium Iodide in Electrolyte System. *Indonesian Journal of Chemistry*, 21(3), 669–678. <https://doi.org/10.22146/ijc.60633>
- Rahmi, H. (2017). Review: Aktivitas Antioksidan dari Berbagai Sumber Buah-Buahan di Indonesia. *Jurnal Agrotek Indonesia*, 2(1), 34–38. <https://doi.org/10.33661/jai.v2i1.721>
- Riaminanti, N.K., Hartiati, A., & Mulyani, S. (2016). Studi Kapasitas dan Sinergisme Antioksidan pada Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica*) dan Daun Asam (*Tamarindus indica* L.). *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, 4(3), 93–104.
- Rikantara, F.S., Utami, M.R., & Kasasiah, A. (2022). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) dan Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) dengan Metode DPPH. Lumbung Farm. *Jurnal Ilmu Kefarmasian*, 3(2), 124–133.
- Septiawan, A.N., Emelda, E., & Husein, S. (2020). Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Etanol Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) dan Ganggang Hijau (*Ulva lactuca* L.). *Journal Indonesian Pharmacy and Natural Medicine*, 4(1), 11–24. <https://doi.org/10.21927/inpharmmed.v4i1.1601>
- Souhoka, F.A., Hattu, N., & Huliselan, M. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Biji Kesumba Keling (*Bixa orellana* L.). *Indonesian Journal Chemistry Research*, 7(1), 25–31. <https://doi.org/10.30598/ijcr.2019.7-fas>
- Suharsanti, R., Astutiningsih, C., & Susilowati, N.D. (2020). Kadar Kurkumin Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma domestica*) Secara KLT Densitometri Dengan Perbedaan Metode Ekstraksi. *Jurnal Wiyata*, 7(2), 86–93.
- Van Nong, H., Hung, L.X., Thang, P.N., Chinh, V.D., Vu, L. Van, Dung, P.T., Van Trung, T., & Nga, P.T. (2016). Fabrication and Vibration Characterization of Curcumin Extracted From Turmeric (*Curcuma longa*) Rhizomes of The Northern Vietnam. *Springerplus*, 5(1147), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2812-2>
- Wahyuningtyas, S.E.P., Permana, I.D.G.M., & Wiadnyani, A.S. (2017). Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Kurkumin dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kunyit (*Curcuma domestica* Val.). *Jurnal ITEPA*, 6(2), 61–70.
- Zuliani, N.E., Erwin, & Kusuma, I.W. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH) Ekstrak Metanol dan Fraksi - Fraksinya dari Daun Rumpuk Knop (*Hyptis capitata* Jacq.). *Jurnal Atomik*, 4(1), 36–40.