

Uji Aktivitas Antioksidan Serta Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) Serta Fraksinya

Antioxidant Activity And Determination Of Total Flavonoids Content Of Ethanol Extract Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) Leaves And Their Fraction

¹Citra Nadaa, ²Yani Lukmayani, ³Livia Syafnir

^{1,2,3}Prodi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Bandung, Jl. Ranggagading No.8 Bandung 40116

email: ¹citranaadaa@gmail.com, ²lukmayani@gmail.com, ³livia.syafnir@gmail.com

Abstract. Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) was known to have flavonoid compounds which act as antioxidants. This research aimed to examine antioxidant activity and measure flavonoids content in kesemek leaves. The extraction was done by maceration method using ethanol 96% as solvent. Fractionation of extract was done by liquid-liquid extraction method using n-hexane, ethyl acetate, and water as solvent. Extract and fraction were monitored by TLC using silica gel GF₂₅₄ as stationary phase and n-hexane: ethyl acetate (3:7) as mobile phase. Antioxidant activity of kesemek leaves was performed using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) free radical scavenging method with vitamin C as a comparison. Determination of total flavonoid content was conducted using UV-Visible Spectrophotometry with quercetin as a comparison. Antioxidant activity results showed that ethyl acetate fraction has strong antioxidant activity with the IC₅₀ value at 76,72 ppm, on other hands the IC₅₀ value of water fraction, ethanol extract and n-hexane fraction in a row is 80,52 ppm; 87,37 ppm and 209,64 ppm. Vitamin C as a comparison showed the IC₅₀ value at 4,01 ppm. Determination of total flavonoids content showed that ethanol extract had greater levels with value at 23,95 mg QE/g extract, on the other hand, the value of ethyl acetate fraction, n-hexane fraction and water fraction in a row were 22,13 mg QE/g extract, 13,00 mg QE/g extract, dan 2,18 mg QE/g extract.

Keyword: Kesemek leaves (*Diospyros kaki* Thunb.), antioxidant, total flavonoids content

Abstrak. Tumbuhan kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) diketahui memiliki kandungan senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid total dari daun kesemek. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat dan air. Terhadap ekstrak dan fraksi dilakukan pemantauan dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan fase diam silika GF₂₅₄ dan fase gerak n-heksan : etil asetat (3: 2). Pengujian aktivitas antioksidan daun kesemek menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dengan pembanding vitamin C. Penetapan kadar flavonoid total dilakukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Sinar tampak dengan pembanding kuersetin. Hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dengan nilai IC₅₀ 76,72 ppm dilanjutkan dengan fraksi air, ekstrak etanol dan fraksi n-heksan dengan nilai IC₅₀ berturut-turut adalah 80,52 ppm, 87,37 ppm dan 208,64 ppm. Untuk pembanding vitamin C memberikan nilai IC₅₀ 4,01 ppm. Hasil penetapan kadar flavonoid total menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki kadar flavonoid total yang besar, yaitu 23,95 mg QE/g ekstrak, dilanjutkan dengan fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air berturut-turut adalah 22,13 mg QE/g ekstrak, 13,00 mg QE/g ekstrak, dan 2,18 mg QE/g ekstrak.

Kata Kunci: Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.), antioksidan, flavonoid total

A. Pendahuluan

Indonesia merupakan salah satu negara yang dikenal memiliki banyak keanekaragaman hayati. Pada era sekarang, banyak orang yang kembali

menggunakan bahan-bahan alam dalam membiasakan hidup dengan menghindari bahan-bahan kimia sintesis dan lebih mengutamakan bahan-bahan alami. Salah satunya adalah penggunaan tanaman obat

(Kardinan, 2004).

Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) termasuk keluarga Ebenaceae. Kesemek dibudidayakan didaerah yang luas, seperti di Asia Timur, Spanyol, Israel dan Indonesia. Pada daun kesemek mengandung tanin, asam organik, phenol dan flavonoid yang berkhasiat sebagai antioksidan (Isnindar, *et al.*, 2011).

Flavonoid merupakan salah satu komponen senyawa yang ada pada hampir setiap tanaman dengan kadar rata-rata 0,25% (Hertog, 1992). Senyawa flavonoid mempunyai aktivitas utama sebagai antioksidan yang dapat dimanfaatkan sebagai antifungi, antiviral, dan penangkap radikal bebas (Mallikarjunan, 2008). Flavonoid memiliki aktivitas antioksidan karena flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi. Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan karena mampu mentransfer sebuah elektron kepada senyawa radikal bebas (Neldawati, 2013).

Antioksidan merupakan suatu inhibitor yang dapat digunakan untuk menghambat autooksidasi. Inhibitor radikal bebas menghambat reaksi radikal bebas dengan membentuk radikal bebas tak reaktif dan relatif stabil. Salah satu sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan. (Neldawati, 2013).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat dirumuskan permasalahan yaitu apakah ekstrak dan fraksi daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) memiliki aktivitas antioksidan, serta berapa kadar flavonoid totalnya.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antioksidan yang terdapat pada ekstrak dan fraksi daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.), serta mengetahui kadar flavonoid totalnya.

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai aktivitas antioksidan serta jumlah kandungan flavonoid total yang terdapat pada ekstrak dan fraksi daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.).

B. Landasan Teori

Pada pengobatan tradisonal tumbuhan kesemek banyak digunakan untuk berbagai pengobatan seperti menurunkan tekanan darah, efek diuretik, batuk dan juga mengurangi penyakit degeneratif. Pada daun kesemek mengandung flavonoid, oligomers, tanin, asam organik, klorofil dan phenol yang berkhasiat sebagai antioksidan (Isnindar, *et al.*, 2011).



Gambar 1. Daun Kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.)

Antioksidan adalah zat yang dapat melawan pengaruh bahaya dari radikal bebas sebagai hasil metabolisme oksidatif, yaitu hasil reaksi-reaksi kimia dan proses metabolik yang terjadi di dalam tubuh. Antioksidan memiliki fungsi untuk menghentikan atau memutuskan reaksi berantai dari radikal bebas yang terbentuk di dalam tubuh, sehingga dapat menyelamatkan sel-sel tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Hernani 2005). Senyawa antioksidan seperti fenol, polifenol, dan flavonoid dapat menghambat mekanisme oksidasi yang disebabkan radikal bebas (Shahidi, 1997).

Efek flavonoid terhadap macam-macam organisme sangat banyak macamnya dan dapat menjelaskan

mengapa tumbuhan yang mengandung flavonoid dipakai dalam pengobatan tradisional. Flavonoid merupakan pereduksi yang baik dengan cara menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid bertindak sebagai penampung yang baik radikal hidroksi dan superoksida sehingga dapat melindungi lipid membran terhadap reaksi yang merusak (Robinson, 1995: 192-193).

C. Metode Penelitian

Pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas antioksidan serta penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) serta fraksinya. Tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini diawali dengan pengumpulan bahan, determinasi tumbuhan, pembuatan simplisia (sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, sortasi kering) dilanjutkan dengan penapisan fitokimia simplisia, ekstraksi, penapisan fitokimia ekstrak, fraksinasi, pemantauan KLT, uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dan penetapan kadar flavonoid total.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang telah dipekatkan dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair (ECC) dengan tiga pelarut yang kepolaran berbeda. Setelah diperoleh fraksi selanjutnya dipekatkan kembali menggunakan *rotary vacuum evaporator*. Selanjutnya dilakukan pemantauan ekstrak dan fraksi dengan metode KLT yang diamati dibawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Terhadap ekstrak dan fraksi dilakukan pengujian aktivitas antioksidan dengan metode peredaman radikal bebas DPPH dan penetapan kadar flavonoid yang dihitung menggunakan spektrofotometri UV-Sinar tampak

dengan panjang gelombang 436 nm.

D. Hasil Penelitian dan Pembahasan

Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Bahan tumbuhan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tumbuhan kesemek (*Diospyros kaki* Thunb.) yang berasal dari Kebun Percobaan Manoko, Lembang, Kabupaten Bandung Barat sebanyak 9 kg. Tumbuhan kesemek diuji determinasi di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Uji determinasi ini dilakukan guna mengetahui kebenaran identitas bahan. Berdasarkan hasil determinasi diketahui bahan tumbuhan yang digunakan yaitu tumbuhan kesemek dengan nama latin *Diospyros kaki* Thunb.

Pembuatan Simplisia

Dari 9 kg daun segar, diperoleh 696 g serbuk kasar simplisia yang kemudian disimpan pada wadah bersih, kering dan tertutup guna menjaga mutu dari simplisia tersebut.

Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan pada simplisia dan ekstrak yang bertujuan untuk menentukan golongan senyawa aktif dari daun kesemek ini. Penapisan fitokimia merupakan cara sederhana untuk melakukan analisis kualitatif kandungan senyawa yang terdapat dalam tumbuhan. Hasil penapisan fitokimia simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil pengujian penapisan fitokimia

Senyawa	Simplisia	Ekstrak
Alkaloid	(-)	(-)
Flavonoid	(+)	(+)
Polifenolat	(+)	(+)
Saponin	(+)	(+)
Kuinon	(+)	(+)
Tanin	(+)	(+)
Monoterpen/sesquiterpen	(+)	(+)
Steroid	(+)	(+)
Triterpenoid	(-)	(-)

Ekstraksi

Ekstrak daun kesemek dibuat menggunakan metode ekstraksi dengan cara dingin maserasi dimana metode ini memiliki keuntungan utamanya yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, dan metode ini tidak dipanaskan sehingga bahan alam yang dikandungnya tidak terurai.

Jumlah simplisia yang digunakan dalam tahap ekstraksi maserasi ini digunakan sebanyak 500 g menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 3,5 L. Penggunaan pelarut tersebut dikarenakan pada pelarut etanol 96% merupakan pelarut yang universal dan juga dapat menarik senyawa polar maupun non polar. Ekstrak kental etanol yang didapatkan dari proses maserasi tersebut sebesar 90,528 g sehingga diperoleh % rendemen ekstrak sebesar 18,106 %.

Fraksinasi

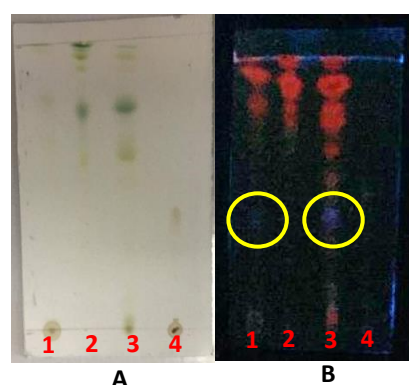
Fraksinasi dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa yang terdapat pada daun kesemek berdasarkan kepolarannya, yaitu non polar, semi polar dan polar dimana fraksinasi ini memiliki prinsip *like dissolves like*. Ekstrak kental yang dipakai sebanyak 70 g dengan menggunakan tiga pelarut yang memiliki sifat kepolaran berberda yaitu n-heksan, etil asetat dan air. Hasil rendemen fraksinasi dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Hasil rendemen fraksinasi

Bahan uji	Jumlah yang diperoleh (g)	Rendemen (%)
Fraksi n-heksan	2,11	3,01
Fraksi etil asetat	6,02	8,60
Fraksi air	15,18	21,68

Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Pemantauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan terhadap ekstrak etanol dan ketiga fraksi. Fase diam yang digunakan berupa silica gel GF₂₅₄ sedangkan fase gerak yang digunakan adalah n-heksan:etil asetat (3:2). Hasil pemantauan KLT dapat dilihat pada **Gambar 2**.

**Gambar 2.** Kromatogram pemantauan ekstrak dan fraksi

Keterangan:

1. ekstrak etanol
 2. fraksi n-heksan
 3. fraksi etil asetat
 4. fraksi air
- A. penampak bercak DPPH 5%
B. penampak bercak sitroborat + UV 366 nm

Berdasarkan kromatogram pada **Gambar 2**, pada plat KLT pengujian aktivitas antioksidan setelah diberi penampak bercak DPPH 5% menghasilkan warna kuning yang dapat terlihat secara visual yang menandakan adanya aktivitas antioksidan pada sampel. Hal tersebut dikarenakan warna ungu pada larutan DPPH ketika tercampur dengan senyawa yang dapat memberikan atom hidrogen maka

molekul DPPH akan tereduksi ditandai dengan berubahnya warna ungu menjadi kuning, sedangkan pada plat KLT pengujian flavonoid total setelah diberi penampak bercak sitroborat terdapat spot biru berpendar/berfluoresensi pada ekstrak etanol dan fraksi etil asetat saja ketika dilihat di bawah sinar UV 366 nm.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan terhadap ekstrak etanol dan fraksi menggunakan spektrofotometer UV-Sinar tampak. Pengujian ini dilakukan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) yang dimana molekulnya memiliki karakter sebagai radikal bebas yang stabil. Metode DPPH ini dipilih karena merupakan metode yang sederhana, cepat, mudah, cukup teliti dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. Larutan DPPH dibuat dalam metanol dengan konsentrasi 60 ppm. Dari pengujian tersebut diperoleh panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 516 nm dimana panjang gelombang maksimum tersebut digunakan pada pengukuran absorbansi kontrol dan sampel. Pada pengujian aktivitas antioksidan ini digunakan larutan pembanding vitamin C, dimana vitamin C memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dan memiliki kemampuan mereduksi (Almatsier, 2009). Konsentrasi aktivitas antioksidan yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi daun kesemek ini dapat ditentukan dengan menghitung nilai *Inhibition Concentration 50%* (IC_{50}). Nilai IC_{50} adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak atau fraksi yang mampu meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antioksidannya. Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil uji aktivitas antioksidan

Bahan uji	IC_{50}
Vitamin C	4,01 ppm
Ekstrak etanol	87,37 ppm
Fraksi n-heksan	208,64 ppm
Fraksi etil asetat	76,72 ppm
Fraksi air	80,52 ppm

Nilai IC_{50} yang diperoleh dari fraksi etil asetat lebih kuat dibandingkan dengan fraksi n-heksan, fraksi air maupun ekstrak etanol. Tingkat kekuatan antioksidan dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Tingkat kekuatan antioksidan (Jun,2006)

Intensitas	IC_{50}
Sangat aktif	< 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm

Berdasarkan **Tabel 3** dan **Tabel 4** dapat dinyatakan bahwa pembanding vitamin C memiliki tingkat kekuatan antioksidan yang sangat aktif dengan nilai IC_{50} 4,01 ppm (<50 ppm), fraksi etil asetat, fraksi air dan ekstrak etanol memiliki tingkat aktivitas antioksidan aktif dengan nilai IC_{50} berturut-turut 76,72 ppm; 80,52 ppm dan 87,37 ppm (50-100 ppm). Sedangkan fraksi n-heksan memiliki tingkat aktivitas antioksidan yang sedang dengan nilai IC_{50} 208,64 ppm (101-250 ppm).

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Pada penetapan kadar flavonoid total terhadap sampel digunakan kuersetin sebagai larutan standar. Pengukuran kadar flavonoid total ini dilakukan penambahan Aluminium (III) klorida yang dapat membentuk

kompleks sehingga dapat terjadi pergeseran panjang gelombang kearah sinar tampak (*visible*) yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning. Penambahan natrium asetat juga dilakukan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah sinar tampak (*visible*) (Chang *et al.*, 2002). Kandungan flavonoid total dinyatakan dalam masa ekuivalen kuersetin tiap gram ekstrak. Hasil pengukuran flavonoid total dapat dilihat pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar flavonoid total

Bahan uji	Kandungan flavonoid total (mg QE/g ekstrak)	Rata-rata kandungan flavonoid total (mg QE/g ekstrak)
Ekstrak etanol	24,17	23,95
	23,74	
Fraksi n-heksan	13,98	13,00
	12,02	
Fraksi etil asetat	20,85	22,13
	23,42	
Fraksi air	2,02	2,18
	2,34	

Berdasarkan data tersebut, ekstrak etanol yang memiliki kadar flavonoid total paling tinggi, dan disusul oleh fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air yang paling rendah. Jika dikaitkan antara hasil kadar flavonoid total dengan hasil aktivitas antioksidan, fraksi etil asetat relatif memiliki kadar flavonoid yang baik dan aktivitas antioksidan yang kuat.

E. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa aktivitas antioksidan yang paling kuat adalah fraksi etil asetat dengan nilai IC_{50} 76,72 ppm dilanjutkan dengan fraksi air, ekstrak etanol, dan fraksi n-heksan

dengan nilai IC_{50} berturut-turut 80,52 ppm, 87,37 ppm, dan 208,64 ppm. Pada penetapan kadar flavonoid total, ekstrak etanol memiliki kadar flavonoid total yang lebih besar yaitu 23,95 mg QE/g ekstrak, dilanjutkan dengan fraksi etil asetat, fraksi n-heksan, dan fraksi air berturut-turut adalah 22,13 mg QE/g ekstrak; 13,00 mg QE/g ekstrak; dan 2,18 mg QE/g ekstrak.

Daftar Pustaka

- Almatsier, S. (2009). *Prinsip Dasar Ilmu Gizi*. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Chang, H.Y., HO, Y.L., Sheu, M.J., Lin, Y.H., Tseng M.C., Wu, S.H., Huang G.J. dan Chang, Y.S. (2002)., Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of *Phellinus merrillii* Extracts. *Botanical Studies*.
- Hernani, Rahardjo M. (2005). *Tanaman Berkhasiat Antioksidan*. Jakarta: Penebar Swadaya dalam Rohmatussolihat. (2009). *Antioksidan, Penyelamat Sel-sel Tubuh Manusia*. *BioTrends* 4 (1): 5-11
- Hertog et al. (1992). Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in The Netherlands. *Agr Food* .Vol 40: 2379-2383
- Isnindar, Subagus, Erna. (2011). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Daun (*Diospyros kaki* Thunb.) Dengan Metodeppil (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Yogyakarta: Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada. Vol. 16(3), 157 – 164
- Jun, M.H.Y., J., Fong, X., Wan, C.S., Yang, C.T., Ho. (2003). *Camparison of Antioxidant*

- Activities of Isoflavones Form Kudzu Root (*Pueraria lobata* O). *Journal Food Science Institute of Technologist*. 68:2117-2122.
- Kardinan A, Kusuma FR. (2004). *Meniran Penambah Daya Tahan Tubuh Alami*. Agromedia Pustaka, Jakarta
- Mallikarjunan, P., Sean O'Keefe C.C., Mike Zhang, C.C., (2008). *Optimizing the Extraction of Phenolic Antioxidant Compounds from Peanut Skins* tameshia s.ballard, Faculty of Virginia Polytechnic Institute.
- Neldawati, RG.(2013). *Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid Untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat*. *Pillar of Physics*, Jurusan Fisika, Universitas Negeri Padang. Vol 2:, 76-83
- Robinson,T. (1995), *Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Imam Sudiro. Institut Teknologi Bandung Press, Bandung
- Shahidi,F., (1997), *Natural Antioxidant, Chemistry, Health Effect and Application*, Illinois. AOCS Press.