

DETERMINATION OF TOTAL PHENOL AND FLAVONNOIDS LEVELS AND THE ANTIOXIDE ACTIVITY TEST OF ETHANOL EXTRACTS, ETHYL ACETATE, AND N-HEXANE SIAM ORANGE (Citrus reticulata Blanco) ACTIVITIES WITH DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) AND ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolin) -6-sulfonate)

Mila Miranti, Faizah Min Fadhlillah, Diki Prayugo Wibowo
Fakultas MIPA-Universitas Garut, Jl. Jati No.42B, Tarogong, Garut

Mila Miranti (milamiranti12@gmail.com)

Abstract

Siam orange (Citrus reticulate Blanco) has a distinctive the scent, refreshing, good taste, sweet, and a sour taste, fresh and yellowish skin color. Conjoined oranges contain less Vitamin C than sweet oranges, but contain higher Vitamin A. Vitamin A is very good for eye health. The purpose of this study was to determine the levels of total phenols and flavonoids as well as the antioxidant activity of ethanol, ethyl acetate, and n-hexane extracts from siam orange leaves. Extraction of conjoined orange leaves used the maceration method. Determination of total phenol and flavonoid levels used the colorimetric method and testing the antioxidant activity used the DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) method and ABTS (2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazolinsulfate). Based on the results obtained ethanol extract of siam orange leaves, it has the highest total phenol and flavonoid is levels of 142.022 mg GAE / g sample, ethyl acetate extract 74.598 mg GAE / g sample, n-hexane extract 57.173 mg GAE / g sample. And the highest total flavonoids were each ethanol extract 45,956 mg QE / g sample, ethyl acetate extract 40,224 mg QE / g sample, n-hexane extract 38,542 mg QE / g sample. IC50 ethanol extract calculation results has the highest antioxidant activity with IC50 values for DPPH and ABTS respectively 23.10 ppm and 23.71 ppm, ethyl acetate extract 35.81 ppm and 24.84 ppm, n-hexane extract 40.42 ppm and 26.43 ppm.

Keywords: *Orange, Phenols and Total Flavonoids, Antioxidants, DPPH, and ABTS*

PENETAPAN KADAR FENOL DAN FLAVONOID TOTAL SERTA UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL, ETIL ASETAT, DAN *n*-HEKSAN DAUN JERUK SIAM (*Citrus reticulata* Blanco) DENGAN METODE DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DAN ABTS

(2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfonat)

Abstrak

Jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco) memiliki aroma yang khas, menyegarkan, rasanya enak, manis, memiliki rasa asam, segar dan warna kulit kekuning-kuningan. Jeruk siam mengandung Vitamin C lebih sedikit dari pada jeruk manis, tetapi mengandung Vitamin A lebih tinggi. Vitamin A ini sangat baik sekali bagi kesehatan mata. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui kadar fenol dan flavonoid total serta aktivitas antioksidan ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan dari daun jeruk siam. Ekstraksi daun jeruk siam menggunakan metode maserasi. Penentuan kadar fenol dan flavonoid total menggunakan metode kolorimetri serta pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolinsulfat)). Berdasarkan hasil yang diperoleh dari ekstrak etanol memiliki kadar fenol dan flavonoid total tertinggi masing-masing sebesar 142,022 mg GAE/g Sampel, ekstrak etil asetat 74,598 mg GAE/g Sampel, ekstrak *n*-heksan 57,173 mg GAE/g Sampel. Dan flavonoid total tertinggi masing-masing ekstrak etanol 45,956 mg QE/g Sampel, ekstrak etil asetat 40,224 mg QE/g Sampel, ekstrak *n*-heksan 38,542 mg QE/g Sampel. Hasil perhitungan IC_{50} ekstrak etanol memiliki aktivitas antioksidan tertinggi dengan nilai IC_{50} untuk DPPH dan ABTS masing-masing sebesar 23,10 ppm dan 23,71 ppm, ekstrak etil asetat 35,81 ppm dan 24,84 ppm, ekstrak *n*-heksan 40,42 ppm dan 26,43 ppm.

Kata kunci : Jeruk Siam, Fenol dan Flavonoid Total, Antioksidan, DPPH, dan ABTS

Pendahuluan

Indonesia termasuk ke dalam salah satu wilayah tropis di dunia yang dikenal dengan keanekaragaman floranya, hal itu kemudian menjadi salah satu pilar kekayaan Indonesia. Tanaman tersebut menarik perhatian untuk diteliti dan dikembangkan sebagai bahan sediaan obat. Pemanfaatan tanaman obat dipercaya dapat menangkal berbagai penyakit yang salah satunya dipicu akibat meningkatnya radikal bebas dalam tubuh.¹

Para ahli biokimia menyebutkan bahwa radikal bebas merupakan salah satu bentuk senyawa oksigen reaktif, yang secara umum diketahui sebagai senyawa yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Senyawa ini terbentuk didalam tubuh, dipicu oleh bermacam-macam faktor. Antioksidan merupakan senyawa-senyawa yang mampu menghilangkan, membersihkan, dan menahan efek radikal. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas.²

Jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco) memiliki aroma yang khas, menyegarkan, rasanya enak, manis, memiliki rasa asam, segar dan warna kulit kekuning-kuningan, daging buah mudah terlepas dari kulit ari.³ Jeruk siam mengandung Vitamin C lebih sedikit dari pada jeruk manis, tetapi mengandung Vitamin A lebih tinggi. Vitamin A ini sangat baik sekali bagi kesehatan mata.⁴

Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai aktivitas Jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco) terhadap aktivitas antioksidan sehingga Jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco) dapat dijadikan obat tradisional yang aman dan bermutu.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji aktivitas antioksidan melalui penentuan IC₅₀ perendaman terhadap ekstrak *n*-heksan, ekstrak etil asetat, ekstrak etanol dengan metode DPPH dan ABTS, menentukan fenol total, flavonoid total, menganalisis korelasi antara fenol total, flavonoid terhadap IC₅₀ peredaman DPPH dan ABTS dan menentukan korelasi antara IC₅₀ peredaman metode DPPH dan ABTS. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi antioksidan daun jeruk siam kepada masyarakat dan para peneliti selanjutnya

Metode

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah blender, maserator, corong kaca, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, pipet tetes, rak tabung reaksi, penangas air, spatula, timbangan analitik, satu set alat destilasi, desikator, cawan krus, cawan penguap, kompor listrik, tang krus, tanur, oven, *vaccum rotary evaporator*, labu ukur, erlenmeyer, mikropipet, vial, batang pengaduk, mortir, stamper, kertas saring, kertas saring bebas abu, aluminium foil, lampu UV 254, lampu UV 365, silika gel 60 F₂₅₄ kuvet dan spektrofotometri UV-Vis.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah serbuk simplisia kulit buah jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco), etanol 96%, etil asetat, *n*-heksan, Vitamin C, toluen, aquadest, ammonia, kloroform, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, pereaksi steasny, HCl encer, kloroform, FeCl₃ 1%, amil alkohol, gelatin, serbuk Mg, pereaksi Liebermann Burchad, NaOH, eter, asam galat, kuersetin, DPPH dan ABTS.

Prosedur Rinci

Pengumpulan Bahan

Bagian tanaman yang digunakan adalah daun jeruk siam. Tumbuhan yang dikumpulkan dari Cibolerang, Desa Karangsari, Kecamatan Karangpawitan, Kabupaten Garut.

Determinasi Bahan

Determinasi tanaman bertujuan untuk memastikan identitas bahan yang dikumpulkan. Determinasi dilakukan di Herbarium Bandung Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati Institut Teknologi Bandung

Pengolahan Bahan

Pembuatan simplisia meliputi beberapa proses, mulai dari sortasi basah yang bertujuan untuk memisahkan pengotor. Dilakukan pencucian menggunakan air mengalir untuk menghilangkan pengotor yang masih tertinggal pada saat sortasi basah. Selanjutnya daun jeruk siam dirajang untuk memperkecil ukuran partikel sehingga mempermudah proses pengeringan. Daun yang telah bersih, dikeringkan atau dijemur dengan menggunakan lemari pengering, oven atau sinar matahari bertujuan untuk menurunkan kadar air serta mencegah terjadinya reaksi enzimatik. Setelah itu disortasi kering untuk

memisahkan simplisia dari pengotor yang masih tertinggal. Kemudian simplisia diperkecil ukurannya dengan *caradi blender* dan disimpan dalam wadah yang tertutup rapat.¹⁵

Pengolahan Ekstrak

Ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan daun jeruk siam dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol, etil asetat, dan *n*-heksan. Sebanyak 500 mg simplisia kering selama 3x24 jam pada suhu kamar dengan penggantian pelarut setiap 24 jam. Ekstrak yang diperoleh dipisahkan dari ampasnya dengan cara disaring menggunakan kain flanel, lalu filtrat dikumpulkan dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan diuapkan pada *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental.

Penapisan Fitokimia

Meliputi pemeriksaan terhadap senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, kuinon, steroid, dan triterpenoid.¹⁷

Pemeriksaan Karakteristik Simplisia

Meliputi penetapan kadar air, penetapan kadar abu total, penetapan kadar abu larut air, penetapan kadar abu tidak larut asam, penetapan susut pengeringan, penetapan kadar sari larut air, dan penetapan kadar sari larut etanol.¹⁶

Pemantauan Pola Kromatografi Lapis Tipis

Larutan bahan uji atau pembanding yang sudah disiapkan, ditotolkan pada lempeng (jarak antar totolan sekitar 1-1,5 cm) dengan volume tertentu, jarak 1,5 – 2 cm dari tepi bawah lempeng. Dijenuhkan bejana dengan fase gerak lalu dimasukkan lempeng ke dalam bejana dengan posisi tegak dan bagian tepi bawah tercelup dalam fase gerak tetapi totolan jangan sampai terendam. Bejana ditutup dengan rapat dan dibiarkan fase gerak merambat hingga batas jarak rambat. Dikeluarkan lempeng dan keringkan di udara, perhatikan bercak yang timbul dan fase gerak dari titik penotolan hingga diperoleh R_f . Kemudian disemprot lempeng dengan beberapa pereaksi untuk menentukan golongan senyawa. Pemantauan pola Kromatografi Lapis Tipis (KLT) terhadap ekstrak daun jeruk siam dilakukan dengan menggunakan fase diam silica G 60 F₂₅₄ dan fase gerak *n*-heksan dan etil asetat, yang diamati dibawah Sinar UV 254 nm dan 365 nm.¹³

Penentuan Fenol Total

Pembuatan Larutan Standar Asam Galat

Larutan standar asam galat 1000ppm dan menimbang 100 mL asam galat yang dilarutkan dalam metanol hingga volume 100 mL. Dari larutan tersebut dibuat seri pengenceran 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. Kemudian dipipet 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 dan 0,7mL kemudian dicukupkan dengan metanol hingga 10 mL.¹

Pengukuran Larutan Standar Asam Galat

Masing-masing konsentrasi 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm ditambahkan 0,4 mL pereaksi Folin-Ciocalteu, lalu dikocok hingga homogen dan didiamkan selama 4-8 menit lalu ditambahkan 4 mL larutan Na₂CO₃ 7,5%, dikocok hingga homogen. Ditambahkan metanol hingga 10 mL dan didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 700-800 nm untuk penentuan panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorbansi.¹

Penentuan Kandungan Fenol Total dengan Metode Folin-Ciocalteu

Dibuat larutan stok ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan daun jeruk siam 100 ppm, dibuat pengenceran dengan konsentrasi 700 ppm -800 ppm pada ketiga ekstrak kemudian dipipet sebanyak 0,5 mL dan ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *Folin-Ciocalteu* kemudian dikocok. Didiamkan selama 4-8 menit kemudian Ditambahkan 4,0 mL larutan Na₂CO₃ 7,5% ke dalam campuran. ditambahkan metanol hingga 10 mL dan didiamkan larutan selama 30 menit pada suhu ruangan. Diukur absorbansinya dengan

spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 678 nm. Dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan sehingga kadar fenol yang diperoleh digunakan sebagai ekuivalen asam galat/g ekstrak.¹

Penentuan Flavonoid Total

Pembuatan Larutan Standar Kuersetin

Ditimbang 10 mg baku standar kuersetin dan dilarutkan dalam metanol untuk 1000 ppm. Dari larutan standar kuersetin 1000 ppm. Kemudian dibuat dalam beberapa konsentrasi 40, 50, 60, 70, dan 80 ppm. Dengan dipipet 0,4; 0,5; 0,6; 0,7, dan 0,8 mL. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin ditambahkan 1 mL AlCl_3 2%, dan 8 mL asam asetat 5% dan dicukupkan dengan metanol sampai 10 mL. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 411 nm.¹

Penetapan Kadar Flavonoid Total

Ditimbang sebanyak 100 mg ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan lalu dilarutkan dalam 100 mL metanol, dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 700 ppm untuk ketiga ekstrak kemudian diambil 1 mL ditambahkan 1 mL AlCl_3 2%, dan 8 mL asam asetat 5%. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 411 nm. Larutan sampel dibuat dalam 3 kali replikasi sehingga kadar flavonoid yang diperoleh sebagai ekuivalen kuersetin.¹

Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode DPPH

Pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH meliputi penyiapan sampel, penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan larutan DPPH, penyiapan larutan pembanding (Vitamin C) dan penetapan IC_{50} pada masing-masing sampel.¹⁸

Penyiapan Sampel

Ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan dibuat larutan stok dengan menimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 mL etanol pada kedalaman labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40, dan 50 ppm untuk ekstrak etanol, 20; 30; 40; 50, dan 60 ppm untuk ekstrak etil asetat dan 50; 60; 70; 80, dan 90 untuk ekstrak *n*-heksan.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet sebanyak 1 mL larutan DPPH 25 ppm, ditambahkan dengan 3 mL etanol pada kedalaman labu ukur. Setelah itu dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap kemudian larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang 400-800 nm. Hasil dari penetapan panjang gelombang maksimum menunjukkan absorbansi terbesar pada λ 517 nm.

Pembuatan Larutan DPPH

Ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan etanol pada kedalaman labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm, kemudian dilakukan pengenceran menjadi 25 ppm.

Penyiapan Larutan Pembanding (Vitamin C)

Ditimbang vitamin C sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dengan etanol 100 mL pada kedalaman labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dari larutan stok tersebut diencerkan dengan seri konsentrasi yaitu 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm.

Penetapan IC_{50}

Masing-masing konsentrasi sampel maupun pembanding (Vitamin C) dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan DPPH 25 ppm. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit di tempat yang gelap, serapan diukur dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang maksimum yaitu 517 nm. Setelah nilai absorbansinya didapat, dihitung % inhibisi larutan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abskontrol} - \text{Abs sampel})}{\text{Abskontrol}} \times 100\%$$

Dari % Inhibisi yang diperoleh, ditentukan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang dapat menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC_{50} dapat dihitung dari kurva regresi linier antara % inhibisi dan seri konsentrasi.

Pengujian Aktivitas Antioksidan Dengan Metode ABTS

Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS meliputi penyiapan sampel, penentuan panjang gelombang maksimum, pembuatan larutan DPPH, penyiapan larutan pembanding (Vitamin C) dan penetapan IC_{50} masing-masing sampel.¹⁹

Penyiapan Sampel

Ekstrak etanol, etil asetat dan *n*-heksan dibuat larutan stok dengan menimbang sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 100 mL etanol pa kedalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Dari larutan stok dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40; dan 50 ppm untuk ekstrak etanol dan etil asetat serta 30; 40; 50; 60, dan 70 ppm untuk ekstrak ekstrak *n*-heksan.

Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Dipipet sebanyak 1 mL larutan ABTS, dicukupkan 5 mL dengan etanol pa ditempat gelap, kemudian larutan diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm. Hasil dari penetapan panjang gelombang maksimum menunjukkan absorbansi terbesar pada λ 742 nm.

Pembuatan Larutan ABTS

- i) Larutan a : Ditimbang 20 mg ABTS, dilarutkan dalam 5 mL aquadest, kemudian diinkubasi selama 12 jam.³
- ii) Larutan b : Ditimbang 7 mg $K_2S_2O_8$, dilarutkan dalam 5 mL aquadest, kemudian diinkubasi selama 12 jam.³
- iii) Larutan a dan b dicampur dalam ruang gelap dan dicukupkan volumenya dengan etanol pa dicukupkan 25 mL.³

Penyiapan Larutan Pembanding (Vitamin C)

Ditimbang vitamin C sebanyak 10 mg dilarutkan dengan etanol 100 mL kedalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm. Kemudian dari larutan stok tersebut diencerkan dengan seri konsentrasi yaitu 3, 4, 5, 6, 7, dan 8 ppm.

Penetapan IC_{50}

Masing-masing konsentrasi sampel maupun pembanding (vitamin C) dipipet sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1 mL larutan ABTS. Campuran dihomogenkan pada tempat yang gelap, serapan tersebut diukur pada panjang gelombang maksimum yaitu 742 nmdengan spektrofotometer UV-Vis. Setelah nilai absorbansinya didapat, dihitung % inhibisi larutan dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{(\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel})}{\text{Abs Kontrol}} \times 100\%$$

Dari % Inhibisi yang diperoleh, digunakan untuk memetukan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi yang mampu menghambat 50% radikal bebas. Nilai IC_{50} dapat dihitung dari kurva regresi linier antara % inhibisi dan seri konsentrasi.

Hasil dan Pembahasan

Daun jeruk siam dikumpulkan dan dilakukan sortasi basah yaitu memilih tanaman yang masih segar, dimana sortasi basah ini dilakukan untuk memisahkan dari tanah, krikil, lalu dicuci dengan air mengalir yang bersih untuk dipisahkan dari pengotornya, kemudian dirajang dan selanjutnya dikeringkan yang bertujuan untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik agar simplisia tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama dan dilakukan sortasi kering untuk memastikan dari pengotor yang masih tertinggal saat dilakukan sortasi basah. Simplisia kering kemudian digiling menjadi serbuk yang bertujuan mempermudah penetrasi pelarut pada saat ekstraksi.

Dimana simplisia yang diperoleh dilakukan pemeriksaan karakteristik dengan tujuan untuk menjamin keseragaman mutu simplisia yang terdiri dari pemeriksaan makroskopik, mikroskopik, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar abu larut air, kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, dan susut pengeringan.¹⁶

Tabel V.2

Hasil karakteristik simplisia daun buah jeruk siam (*Citrus reticulata* Blanco)

No	Karakterisasi	Hasil Pemeriksaan %
1	Kadar Air	4 %
2	Susut Pengeringan	5,4 %
3	Kadar Abu Total	10,7 %
4	Kadar Abu Tidak Larut Asam	2 %
5	Kadar Abu Larut Air	8 %
6	Kadar Sari Larut Air	7,6 %
7	Kadar Sari Larut Etanol	2,3 %

Berdasarkan hasil pemeriksaan karakteristik simplisia daun jeruk siam dengan pemeriksaan kadar abu tidak larut asam, kadar abu total dan kadar abu larut air, bertujuan untuk mengetahui senyawa anorganik dari simplisia dan mengetahui jumlah logam alkali tanah. Didapatkan hasil kadar abu total 10,7%, kadar abu tidak larut asam 2 %, dan kadar abu larut air diperoleh 8%. Kadar abu tidak larut asam bertujuan untuk mengetahui jumlah abu yang diperoleh dari faktor eksternal, bersumber dari pengotor yang berasal dari pasir. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan kadar air, untuk memberikan batasan maksimal atau rentang besarnya kandungan air sehingga menentukan kualitas suatu simplisia untuk disimpan dalam jangka waktu yang lama. Kadar air diperoleh sebesar 4%, hasil yang didapat menunjukkan bahwa kadar air simplisia daun jeruk siam memenuhi persyaratan yaitu <10%. Kadar air dibawah <10% dapat mencegah terjadinya reaksi hidrolisis dan pertumbuhan mikroba pada serbuk simplisia.

Pemeriksaan kadar sari larut etanol dan kadar sari larut air bertujuan untuk mengetahui banyaknya komponen yang tersari dengan pelarut air dan pelarut etanol. Kadar sari larut air diperoleh 7,6%, dan kadar sari larut etanol diperoleh 2,3%. Selanjutnya penetapan susut pengeringan bertujuan untuk memberikan batasan maksimal

tentang besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Didapatkan hasil susut pengeringan diperoleh 5,4%. Hasil pemeriksaan simplisia dapat dilihat pada lampiran 6.

Tabel V.3

Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia dan Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan *n*-Heksan Daun Jeruk Siam (*Citrus reticulata* Blanco)

No	Senyawa	Simplisia	Ekstrak		
			Etanol	Etil Asetat	<i>n</i> -Heksan
1	Flavonoid	+	+	+	+
2	Saponin	+	+	+	+
3	Tanin	-	-	-	-
4	Alkaloid	-	-	-	-
5	Steroid	+	+	+	+
6	Kuinon	+	+	+	+
7	Fenol	+	+	+	+

Keterangan : (+) Terdeteksi

(-) Tidak terdeteksi

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa pada simplisia dan ekstrak daun jeruk siam menunjukkan adanya senyawa flavonoid, saponin, fenol, steroid, triterpenoid dan kuinon. Dapat dilihat pada lampiran 7.

Tahap selanjutnya yaitu ekstraksi. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu maserasi. Daun jeruk siam sebanyak 500 gram dengan menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, dan *n*-heksan. Maserasi merupakan proses pengekstrakan dengan cara dingin menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan untuk mencegah terjadinya kejenuhan pada simplisia. Metode maserasi ini dipilih karena prosesnya sederhana dan aman untuk senyawa yang tidak tahan panas atau termolabil. Maserasi ini dilakukan selama 3x24 jam. Tujuan penggunaan tiga pelarut dengan polaritas yang berbeda adalah untuk mengetahui rendemen dan mendapatkan senyawa aktif dari jeruk siam berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda. Ekstrak yang diperoleh disaring dan dipisahkan dari ampasnya kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental etanol, etil asetat, dan *n*-heksan berturut-turut yaitu 17,92; 15,12; dan 3,19gram. Kemudian dilakukan perhitungan nilai % rendemen dari ekstrak dengan membandingkan berat ekstrak kental yang diperoleh dengan berat simplisia. Rendemen yang dihasilkan ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan berturut-turut 3,58%; 3,02%; dan 0,63%.

Selanjutnya penentuan kadar fenol dan flavonoid total terhadap ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan daun jeruk siam. Penentuan kadar fenol total menggunakan reagen *Folin-Ciocalteu* berdasarkan kekuatan mereduksi dari gugus hidroksi fenol sehingga terbentuk senyawa kompleks berwarna biru. Dalam menentukan kadar fenol total digunakan larutan standar asam galat (GAE) karena merupakan turunan dari asam hidroksilbenzoat golongan asam fenol sederhana dan bersifat stabil.¹ Dan ditambahkan Na₂CO₃ sebagai pemberi suasana basa. Kurva standar asam galat memiliki persamaan regresi $y=0,0088X+0,0051$ dengan nilai R² sebesar 0,9925 dari persamaan tersebut dapat diperoleh kadar fenol total.

Tabel V.5

C	Absorban	Kadar Ekuivalen As. Galat ($\mu\text{L/mL}$)	V (L)	Fp	Berat Sampel (mg)	Kadar Fenolik Total (mg GAE/g Sampel)	Rata-Rata Kadar (mg GAE/g Sampel)
EEDJS	0,643	72,489	0,01	20x	0,1	144,977	142,022
	0,623	70,216	0,01	20x	0,1	140,431	
	0,624	70,330	0,01	20x	0,1	140,659	
EEADJS	0,340	38,057	0,01	20x	0,1	76,113	74,598
	0,332	37,148	0,01	20x	0,1	74,295	
	0,328	36,693	0,01	20x	0,1	73,3862	
ENHDJS	0,241	26,807	0,01	20x	0,1	53,613	57,173
	0,298	33,284	0,01	20x	0,1	66,113	
	0,233	25,898	0,01	20x	0,1	51,795	

Ket : - EEDJS = Ekstrak Etanol Daun Jeruk Siam
 - EEADJS = Ekstrak Etil Asetat Daun Jeruk Siam
 - ENHDJS = Ekstrak *n*-Heksan Daun Jeruk Siam

Penentuan kadar flavonoid total dengan metode kolorimetri dengan menggunakan larutan standar kuarsetin (QE). Kemudian ditambahkan AlCl_3 yang dapat membentuk kompleks dengan senyawa kuarsetin menghasilkan warna kuning.¹ persamaan regresi linier $y = 0,0107X - 0,1704$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9976. Dimana kadar fenol total pada ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan berturut-turut sebesar 142,022; 74,598; dan 57,173 mgGAE/g sampel.

Tabel V.7
Hasil Perhitungan Kadar Fenol Total

Sampel	Absorban	Kadar Ekuivalen Kuersetin ($\mu\text{l/mL}$)	V (L)	Fp	Berat Sampel (mg)	Kadar Flavonoid Total (mg QE/g Sampel)	Rata-Rata Kadar (mg QE/g Sampel)
EEDJS	0,323	14,262	0,01	10x	0,1	46,112	45,956
	0,319	13,888	0,01	10x	0,1	45,738	
	0,322	14,168	0,01	10x	0,1	46,018	
EEADJS	0,258	8,187	0,01	10x	0,1	40,037	40,224
	0,262	8,561	0,01	10x	0,1	40,411	
	0,26	8,374	0,01	10x	0,1	40,224	
ENHDJS	0,243	6,785	0,01	10x	0,1	38,635	38,542
	0,241	6,598	0,01	10x	0,1	38,448	
	0,242	6,692	0,01	10x	0,1	38,542	

Ket : - EEDJS = Ekstrak Etanol Daun Jeruk Siam
 - EEADJS = Ekstrak Etil Asetat Daun Jeruk Siam
 - ENHDJS = Ekstrak *n*-Heksan Daun Jeruk Siam

Kadar hasil fenol total pada ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan berturut-turut 45,956; 40,224; dan 38,542 mgQE/g sampel. Sehingga nilai kadar fenol total lebih tinggi dibanding dengan flavonoid total karena kadar fenol yang besar dalam ekstrak tidak semuanya merupakan senyawa flavonoid.

Selanjutnya pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS. Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH ini adalah perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan warna tersebut mempengaruhi nilai absorbansi DPPH, semakin tinggi konsentrasi sampel yang digunakan maka semakin rendah nilai absorbansi dari larutan DPPH. Perubahan warna ini terjadi karena adanya senyawa yang memberikan atom hidrogen kepada radikal DPPH.^{10,18} Dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS didapatkan panjang gelombang maksimum DPPH yaitu 517 nm.

Metode ABTS didasarkan pada kemampuan mereduksi radikal ABTS. Prinsip dari metode ini adalah reaksi antioksidan dengan kation radikal ABTS dan mempunyai absorpsi kromofor biru-hijau karena adanya reaksi oksidasi dari ABTS dengan kalium persulfat. Pengujian antioksidan dengan metode ABTS didasarkan pada hilangnya warna biru karena tereduksinya ABTS oleh antioksidan.¹⁹ Dari hasil *scanning* diperoleh panjang gelombang maksimum ABTS yaitu 742 nm dengan absorban 0,688.

Selanjutnya kontrol positif digunakan vitamin C, karena dapat larut dalam pelarut polar dan senyawa yang terdapat dalam vitamin C ini mempunyai kemampuan meredam atau menangkal radikal bebas sangat baik dan banyak digunakan oleh para peneliti sebagai kontrol positif khususnya pada uji aktivitas antioksidan.⁸

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan vitamin C sebagai larutan pembanding memiliki nilai IC_{50} sebesar 8,522 ppm sedangkan hasil kadar untuk ekstrak etanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak *n*-heksan berturut-turut memiliki IC_{50} sebesar 23,10; 35,81; dan 40,41 ppm dengan konsentrasi yang sama. Dari hasil pengujian dapat diketahui bahwa ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-heksan dikategorikan antioksidan sangat kuat karena berada pada rentang <50 ppm. Dapat dilihat pada lampiran 10.

Hasil pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS menunjukkan vitamin C sebagai larutan pembanding memiliki nilai IC_{50} sebesar 5,546 ppm sedangkan untuk ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-heksan berturut-turut memiliki IC_{50} sebesar 23,71; 24,84; dan 26,43 ppm dengan konsentrasi yang sama. Dari hasil pengujian dapat diketahui bahwa ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-heksan daun jeruk siam dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat karena berada direntang >50 ppm. Dapat dilihat pada lampiran 11.

Dari hasil perhitungan dapat dilihat bahwa nilai IC_{50} vitamin C lebih kecil dari IC_{50} ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, ekstrak *n*-heksan daun jeruk siam baik dengan metode DPPH maupun ABTS karena daun jeruk siam merupakan ekstrak kasarnya dan terdiri dari campuran beberapa senyawa sedangkan vitamin C merupakan senyawa murni.

Berdasarkan metode DPPH dan metode ABTS dapat dilihat nilai IC_{50} , ABTS memberikan nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan DPPH tetapi jika dilihat dari perlakuan atau cara kerja metode DPPH lebih cepat, mudah, dan stabil dibandingkan metode ABTS karena banyak perlakuan yang harus dilakukan sehingga faktor kesalahan semakin tinggi dan waktu yang diperlukan semakin lama.

Selanjutnya identifikasi senyawa yang diduga bertanggung jawab sebagai antioksidan menggunakan pemantauan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis). Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄ dan fase geraknya eluen dengan menggunakan perbandingan etil asetat : *n*-heksan (6:4). Larutan ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan ditotolkan pada plat KLT dengan ukuran 3x8 cm. Untuk senyawa flavonoid, pada plat yang lain disemprot penampak bercak AlCl₃, selanjutnya dilakukan pengamatan bercak dibawah lampu UV 365 nm. Bercak pada KLT yang apabila bercak berwarna kuning dapat menunjukkan adanya senyawa flavonoid. Kemudian pada plat KLT yang lain dilakukan penyemprotan dengan penampak bercak universal yaitu H₂SO₄. Deteksi menggunakan sinar UV 254 nm ini bisa berfluoresensi (berpendar) ditandai dengan adanya noda-noda menggunakan sinar UV 365 untuk mengetahui spot yang dapat berfluoresensi (berpendar) pada panjang gelombang 365 nm. Pada plat KLT untuk senyawa fenolik, setelah dielusi noda diamati dengan menggunakan lampu UV kemudian dilakukan penyemprotan dengan reagen besi (III) klorida (FeCl₃). Positif mengandung fenol jika noda berwarna hijau, ungu, merah, hitam atau biru yang kuat

Dari hasil KLT, pada plat yang disemprot pada penampak bercak spesifik flavonoid (AlCl₃) menimbulkan bercak warna ungu positif flavonoid dilihat secara visual senyawa pada ekstrak etanol dan etil asetat berturut-turut dengan nilai RF yaitu Rf₁ 0,5 Rf₂ 0,66, dan Rf₃ 0,83. Selanjutnya pada penampak bercak spesifik fenol (FeCl₃) menimbulkan bercak warna hitam positif fenol dilihat secara visual pada ekstrak etanol dan etil asetat berturut-turut dengan nilai Rf₁ 0,81 dan Rf₂ 0,88. Selanjutnya pada plat yang lain dengan

sistem yang sama disemprot dengan penampak bercak H₂SO₄ untuk melihat adanya senyawa steroid dengan nilai R_{f1} 0,50 R_{f2} 0,46 dan R_{f3} 0,65. Senyawa yang diduga berperan dalam memberikan aktivitas antioksidan pada ekstrak etanol, etil asetat, dan *n*-heksan adalah senyawa fenol dan flavonoid.

Kesimpulan

Kadar fenol total yang dihasilkan dari ekstrak etanol, ekstrak etil asetat, dan *n*-heksan daun jeruk siam yaitu 142,022; 74,598; 57,173 mgGAE/g sampel. Dan flavonoid total yaitu 45,956; 40,224; dan 38,542 mgQE/g sampel. Dari pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dan ABTS ekstrak etanol, ekstrak etil asetat dan ekstrak *n*-heksan memiliki aktivitas sebagai antioksidan dengan kategori antoksidan sangat kuat karena pada rentang <50 ppm. Kadar fenol dan flavonoid total berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan ekstrak, semakin tinggi kadar fenol dan flavonoid total maka aktivitas antioksidannya juga tinggi dilihat dari nilai IC₅₀.

Daftar Pustaka

1. Senet MRM, Parwata IMO, dan Sudiarta IW. Kandungan Total Fenol dan Flavonoid dari Buah Kersen (*Muntingia Calabura*) serta Aktivitas Antioksidannya. *Jurnal Kimia*. 2017 : 11(2); 187, 189.
2. Winarsi H. *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*. Yogyakarta: PT. Kansius; 2007 : 12, 79-81, 137.
3. Deptan. *Profil Jeruk di Kabupaten Garut*. Garut; Dinas Pertanian; 213 : 13.
4. Nahasari ND. *Bercocok Tanam Jeruk*. Jakarta: Azka Mulia Media; 2007: 3,4,12-14, 59, 60.
5. Kaleka N. *Budidaya Jeruk Siam*. Surakarta: Bisa Publishing; 2016: 17, 18, 22.
6. Hanani E. *Analisis Fitokimia*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC. 2015: 10.
7. Departemen Kesehatan Republik Indonesia Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. 2000.
8. Sayuti K, Yenrina R. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. [Internet]. Padang : Andalas University Press; 2015: 15, 16, 76.
9. Diana Serlahwaty, Atika Nourmela Sevian. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 90% Kombinasi Buah Strawberry Dan Tomat Dengan Metode ABTS*. Universitas Pancasila, Srengseng Sawah Jagkarsa Jakarta Selatan 2016, 1-2.
10. Finna Setiawan, Oeke Yunita dan Ade Kurniawan. *Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Kayu Secang (Caesalpinia sappan) Menggunakan Metode DPPH, ABTS, dan FRAP* Fakultas Farmasi Universitas Surabaya, Surabaya 2018, 2.

11. Harmita. Analisis Fisikokimia: Potensiometri dan Spektroskopi Volume 1. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2015: 19, 23.
12. Watson DG. Analisis Farmasi: Buku Ajar untuk Mahasiswa Farmasi dan Praktisi Kimia Farmasi. Edisi 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2010:105, 106, 110, 135, 136.
13. Harmita. Analisis Fisikokimia: Kromatografi Volume 2. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 2015: 11,22.
14. Harborne JB. Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Bandung : Institut Teknologi Bandung; 1996:6.
15. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Cara Pembuatan Simplisia. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan;1985: 4-22.
16. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi I. Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia; 2013: 175-189.
17. Mondong FR, Sangi MS, dan Kamaunang M. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Patikan Emas (*Euphorbia prunifoli* Jacq.) Dan Bawang Laut (*Proiphys amboinensis* (L. Herb) . Jurnal MIPA UNSRAT ONLINE. 2015 : 2(1) ; 8187.
18. Artanti, An dan Lisnasari, R. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Family Solanum Menggunakan Metode Reduksi Radikal Bebas DPPH. Journal of Pharmaaceutical Science and Clinical Research. 2018 : 02; 64-65.
19. Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Zevallos LC, dan Byrne DH. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP. And ORAC assay for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. Journal of Food Composition and Analysis. 2006 : 19 ; 669-675.
20. Mangela O, Ridhany A, dan Musafira. Kajian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Tembelekan (*Lantana camara* L) Berdasarkan Tingkat Kepolaran Pelarut.KOVALEN. 2016 : 2(3); 19pISSN: 2477-5398

