

Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) Menggunakan Metode ABTS serta Penetapan Kadar Fenolik dan Flavonoid Total

Delyla Irma Safarina Savitri¹, Khoirul Anwar^{*2}, Kiki Damayanti³

¹Program Studi Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Indonesia

²Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Indonesia

³Departemen Farmakologi dan Farmasi Klinik, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Indonesia

*e-mail : khoirula@unwahas.ac.id

Article Info

Article history:

Submission Juni 2024

Review Juli 2024

Accepted September 2024

Abstrak

Buah kemukus (*Piper cubeba* L.) diketahui mengandung senyawa fenolik dan flavonoid total yang dapat berperan sebagai antioksidan dan dapat menangkal radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus menggunakan metode ABTS serta penetapan kadar fenolik dan flavonoid total. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus dengan konsentrasi (15, 30, 45, 60, 75, dan 90 µg/mL) diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS dengan pembanding Trolox konsentrasi (5, 10, 15, 20, 25, dan 30 µg/mL) dan diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 730 nm. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total menggunakan pereaksi folin-ciocalteu dan AlCl_3 dengan pembanding asam galat konsentrasi (50, 100, 150, 200, 250, dan 300 µg/mL) dan kuersetin konsentrasi (2, 4, 6, 8, 10, dan 12 µg/mL), kemudian diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 743 nm dan 430 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus (*Piper cubeba* L.) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar $50,359 \pm 0,104$ µg/mL menggunakan pembanding trolox dengan nilai IC_{50} sebesar $19,654 \pm 0,18$ µg/mL. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total diperoleh sebesar $32,57 \pm 0,47$ mg GAE/gram fraksi dan $5,283 \pm 0,04$ mgQE/gram fraksi. Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus (*Piper cubeba* L.) dikategorikan sebagai antioksidan kuat.

Kata kunci — Antioksidan, buah kemukus, fenolik, flavonoid, ABTS

Ucapan terima kasih:

Abstract

Piper cubeba fruit (*Piper cubeba* L.) is known to contain total phenolic and flavonoid compounds which can act as antioxidants that can counteract free radicals. This study aims to determine the antioxidant activity of the ethyl acetate fraction of ethanol extract of fruit cubes using the ABTS method as well as determining total phenolic and flavonoid levels. Ethyl acetate fraction of cubeb fruit ethanol extract (*Piper cubeba* L.) with concentrations (15, 30, 45, 60, 75, and 90 µg/mL) were tested for antioxidant activity using the ABTS method with Trolox comparison concentrations (5, 10, 15, 20, 25, and 30 µg/mL) and measured using UV-Vis spectrophotometry at a wavelength of 730 nm. Determination of total phenolic and flavonoid levels using folin-ciocalteu and AlCl_3 reagents with comparison of gallic acid concentrations (50, 100, 150, 200, 250, and 300 µg/mL) and quercetin concentrations (2, 4, 6, 8, 10, and 12 µg/mL), then measured using UV-Vis spectrophotometry at wavelengths of 743 nm and 430 nm. The results showed that the ethyl acetate fraction of cubeb fruit ethanol extract (*Piper cubeba* L.) has antioxidant activity with an IC_{50} value of $50,359 \pm 0.104$ µg/mL using a trolox comparison with an IC_{50} value at 19.654 ± 0.18

µg/mL. Determination of total phenolic and flavonoid levels was obtained at 32.57 ± 0.47 mg GAE / gram and 5.283 ± 0.04 mg QAE / gram. Antioxidant activity of ethyl acetate fraction of cubeb fruit ethanol extract (Piper cubeba L.) is categorized as a powerful antioxidant.

Keyword – Antioxidant, cubeb fruit, phenolic, flavonoid, ABTS

DOI

©2020 Politeknik Harapan Bersama Tegal

Alamat korespondensi:

Prodi DIII Farmasi Politeknik Harapan Bersama Tegal

Gedung A Lt.3. Kampus 1

Jl. Mataram No.09 Kota Tegal, Kodepos 52122

Telp. (0283) 352000

E-mail: parapemikir_poltek@yahoo.com

p-ISSN: 2089-5313

e-ISSN: 2549-5062

A. Pendahuluan

Radikal bebas merupakan molekul atau ion dengan elektron tidak berpasangan, sangat tidak stabil, dan aktif melawan reaksi kimia dengan molekul lain yang mengakibatkan kerusakan sel tubuh. Radikal bebas diproduksi melalui proses biologis sebagai respons terhadap rangsangan eksogen [1]. Reaksi radikal bebas yang berlebih dapat menyebabkan berbagai penyakit dipicu oleh kondisi stres oksidatif. Stres oksidatif adalah keadaan saat jumlah radikal bebas di dalam tubuh melebihi kemampuan tubuh untuk menetralkannya, sehingga dibutuhkan senyawa untuk menetralkan radikal bebas tersebut [1]. Salah satu penyakit yang dapat muncul akibat stress oksidatif adalah penyakit parkinson. Salah satu faktor penyebab dari gejala penyakit Parkinson adalah paparan radikal bebas dan dapat dicegah oleh senyawa yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan [2].

Antioksidan sudah dibuktikan dapat menangkal radikal bebas dengan menonaktifkan atau menstabilkan radikal bebas yang dihasilkan oleh berbagai jenis proses kimia normal tubuh atau pengaruh lingkungan sehingga senyawa radikal menjadi lebih stabil. Antioksidan banyak ditemukan pada buah – buahan, sayur, biji-bijian dan hewan. Salah satunya buah kemukus yang berpotensi sebagai antioksidan alami. Menurut penelitian [3] menyatakan bahwa ekstrak etanol buah kemukus (*Piper cubeba* L.) mengandung glikosida, alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, dan saponin.

Penelitian ini merupakan pengembangan untuk pengujian aktivitas antioksidan dari penelitian [2] yang menyatakan bahwa pada fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus memiliki potensi sebagai antioksidan. Penelitian sebelumnya sudah dibuktikan bahwa pada ekstrak etanol buah kemukus memiliki aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dengan nilai IC_{50} 14,51 μ g/mg [4]. Potensi antioksidan pada ekstrak etanol masih berasal dari semua senyawa yang terdapat pada ekstrak, karena etanol dapat melarutkan senyawa baik polar maupun non polar. Sehingga perlu dilakukan pemisahan senyawa berdasarkan kepolarannya dengan pelarut etil asetat [5].

Etil asetat merupakan pelarut semi polar dan dapat melarutkan senyawa

semipolar pada dinding sel seperti aglikon flavonoid yang dapat diuji aktivitasnya menggunakan metode ABTS. ABTS merupakan suatu metode pengujian aktivitas antioksidan yang sensitif terhadap pelarut polar sampai non polar. Senyawa fenolik dan flavonoid memiliki potensi sebagai antioksidan karena memiliki gugus hidroksil yang terikat pada karbon cincin aromatik sehingga dapat menangkap radikal bebas [5]. Senyawa fenolik dan flavonoid dapat larut dalam pelarut polar seperti metanol, etanol, dan etil asetat. Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS memiliki aktivitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan metode DPPH [6].

Berdasarkan latar belakang diatas, maka perlu dilakukan penelitian pengujian aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus (*Piper cubeba* L.) dengan metode ABTS serta penetapan kadar flavonoid totalnya.

B. Metode

Tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Universitas Wahid Hasyim. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah fraksi etil asetat buah kemukus, pelarut etanol p.a. Bahan untuk penentuan fenolik total yaitu asam galat, Na_2CO_3 7%, *Folin-Ciocalteu*, dan etanol p.a. Serta bahan yang digunakan untuk uji aktivitas antioksidan yaitu ABTS (2,2-Azinobis (3-Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid) p.a (Merck), trolox (Sigma), dan kalium persulfat ($K_2S_2O_8$). Bahan untuk penentuan flavonoid menggunakan bahan yaitu etanol p.a, aquadest, aluminium klorida ($AlCl_3$) 10% (Merck), kalium asetat 1M (CH_3COOK), quersetin (sigma).

Alat yang digunakan dalam pengujian skrining fitokimia yaitu timbangan analitik, seperangkat alat gelas, dan kertas saring, dan *magnetic stirrer*. Alat yang digunakan pada penetapan kadar flavonoid total, fenolik total dan uji aktivitas antioksidan yaitu, mikropipet (biru dan kuning), *yellow tipe*, *blue tipe*, kuvet, dan Spektrofotometer UV-Vis.

Jalannya Penelitian

1. Pembuatan ekstrak etanol 96% buah kemukus

Buah kemukus diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% (1:10). Serbuk kulit buah kemukus sebanyak 325 gram dimasukkan ke dalam toples kaca yang telah dilapisi dengan kertas coklat, lalu ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 2400 mL kemudian toples ditutup rapat menggunakan alumunium foil, agar terhindar dari cahaya matahari langsung dan dilakukan pengadukan selama 15 menit. Proses perendaman dilakukan selama 5 hari dan diaduk selama 15 menit tiap 8 jam sekali.

2. Pembuatan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Kemukus

Ekstrak etanol buah kemukus yang digunakan adalah sebanyak 180 gram, dimana satu siklus pembuatan menggunakan 20 gram. 20 gram ekstrak etanol buah kemukus dilarutkan dalam 200 mL air, kemudian dimasukkan corong pisah. n-heksan sebanyak 200 mL dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojog sambil sesekali kran dibuka untuk mengeluarkan gas. Campuran dalam corong pisah didiamkan hingga memisah menjadi dua fase lapisan yaitu lapisan air dan lapisan n-heksan. Lapisan n-heksan dikeluarkan dan ditampung. Fraksinasi ekstrak etanol buah kemukus diulang hingga lapisan n-heksan jernih. Lapisan air dimasukkan lagi ke dalam corong pisah. Etil asetat sebanyak 200 mL dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojog sambil sesekali kran dibuka untuk mengeluarkan gas. Campuran dalam corong pisah didiamkan hingga memisah menjadi dua fase lapisan yaitu lapisan air dan lapisan etil asetat. Lapisan etil asetat diuapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55°C sampai diperoleh fraksi kental.

3. Uji Aktivitas Antioksidan

1. Pembuatan Larutan ABTS

Serbuk ABTS dan serbuk kalium persulfat masing masing ditimbang sebanyak 100 mg dan 165,6 mg, kemudian masing masing serbuk dilarutkan ke dalam etanol p.a 5 mL. Kedua larutan diambil dan dicampurkan dengan perbandingan 1:1, kemudian larutan tersebut dibungkus dengan alumunium foil supaya tidak terkena cahaya dan diinkubasi didalam ruangan gelap selama 12-16 jam sampai larutan tercampur sempurna [7].

2. Pembuatan Larutan Induk Trolox 1000 ppm

Trolox ditimbang sebanyak 25 mg kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 25 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas.

3. Pembuatan Baku Standar Trolox

Larutan standar dibuat sebanyak 5 mL dengan kadar 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing – masing konsentrasi diambil sebanyak 25 µL, 50 µL, 75 µL, 100 µL, dan 125 µL, kemudian dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas [8].

4. Penentuan Panjang Gelombang

Pembuatan panjang gelombang dilakukan dengan cara menambahkan larutan ABTS kemudian larutan dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 600-800 nm [9].

5. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dengan cara mencampurkan larutan ABTS dan trolox konsentrasi 15 ppm dengan masing-masing sebanyak 1 mL. Kemudian absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 dengan panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh [10]. *Operating time* dapat dilihat dari hasil absorbansi yang paling stabil dan serapan yang paling tinggi. Serapan yang paling

tinggi menunjukkan bahwa sampel sudah bereaksi dengan sempurna [9].

6. Penyiapan Larutan Sampel

1. Pembuatan Larutan Stok Sampel 10.000 ppm

Fraksi etil asetat buah kemukus diambil sebanyak 1.000 mg dan dimasukkan ke dalam beaker gelas 50 mL, kemudian dilarutkan dengan 25 mL etanol p.a dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm sampai terlarut sempurna. Larutan disaring dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL dan dicukupkan dengan menggunakan etanol p.a sampai tanda batas [11].

2. Pembuatan Larutan Stok Sempel 1.000 ppm

Larutan induk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat buah kemukus dengan konsentrasi 10.000 ppm diambil sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas [11].

3. Pembuatan Seri Konsentrasi Larutan Sampel

Seri konsentration dibuat dengan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm, dimasukkan ke dalam labu takar dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas.

7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan

1. Uji Aktivitas Trolox

Larutan trolox dengan kadar 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm, diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan larutan ABTS sebanyak 1 mL. Larutan diinkubasi pada tempat yang gelap selama *operating time*, kemudian dibaca absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimal 730 nm. Lakukan replikasi sebanyak 3 kali. Konsentrasi antioksidan dihitung dengan rumus [12].

2. Uji Aktivitas Antioksidan FEAEBC dan Fraksi Etil Asetat

Larutan sampel disiapkan dengan

konsentrasi 20, 40, 60, 80, 100, dan 120 ppm, masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan dengan 1 mL larutan ABTS. Larutan dihomogenkan dan diinkubasi selama *operating time*, kemudian serapannya dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 730 dan direplikasi 3 kali.

3. Penetapan Kadar Fenolik Total Dengan Spektrofotometer UV-Vis

a. Pembuatan Larutan Induk Asam Galat

Asam galat ditimbang sebanyak 10 mg, dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL, kemudian ditambahkan etanol p.a. sampai tanda batas [13].

b. Pembuatan Larutan Na_2CO_3 7%

Natrium karbonat ditimbang sebanyak 7 gram dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL kemudian dilarutkan dengan Aquadest 25 mL. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL kemudian ditambahkan dengan aquadest hingga tanda batas [13].

c. Pembuatan Larutan Induk Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Kemukus

Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus ditimbang menggunakan cawan porselin sebanyak 1000 mg, dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL dilarutkan dengan etanol p.a 25 mL menggunakan bantuan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm sampai terlarut sempurna, disaring menggunakan kertas saring ke dalam labu takar 100 mL, lalu ditambahkan etanol p.a. hingga tanda batas [13].

d. Pembuatan Seri Konsentrasi Asam Galat

Seri konsentrasi dibuat pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm dalam labu takar 5 mL. Larutan induk asam galat yang diambil dari masing masing seri konsentrasi sebanyak 250 μL , 500 μL , 750 μL , 1000 μL , 1250 μL , dan 1500 μL dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL kemudian dilarutkan dengan etanol p.a. hingga tanda batas [13].

e. Penentuan Panjang Gelombang λ Maksimum Fenolik

Larutan asam galat dengan konsentrasi 150 ppm diambil 200 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi,

- kemudian ditambahkan 400 μL *Folin-Ciocalteu*, ditambahkan 4mL Na_2CO_3 7% kocok hingga homogen. Absorbansi dibaca dengan spektrofotometri UV-Vis dalam rentang panjang gelombang (λ) 600 nm – 800 nm [13].
- f. Pengukuran *Operating Time* (OT)

Larutan asam galat dengan konsentrasi 150 ppm diambil 200 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 400 μL *Folin-Ciocalteu*, ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 7% kocok hingga homogen. Absorbansi dibaca dengan Spektrofotometri UV-Vis dalam rentang waktu 0 - 180 menit pada λ maksimal 743 nm hingga diperoleh waktu serapan yang stabil [13].
 - g. Pembuatan Kurva Asam Galat

Seri konsentrasi asam galat 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm masing – masing diambil 200 μL , dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 400 μL *Folin-ciocalte*, lalu ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 7%. Absorbansi dibaca dengan Spektrofotometri pada panjang gelombang (λ) maksimum yaitu 743 nm dan *operating time* menit ke-105 – 135 menit. Replikasi dilakukan 3 kali [13].
 - h. Penetapan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Kemukus

Larutan stok sampel diambil 200 μL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ditambahkan 400 μL *Folin-ciocalteu*. Ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 7% kocok sampai homogen. Dilakukan pengenceran, larutan diambil 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan ditepatkan volumenya sampai tanda batas. Absorbansi dibaca menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 743nm dan *operating time* menit ke-105, 120, dan 130 menit. Replikasi dilakukan 3 kali [13].
 4. Penetapan Kadar Flavonoid Total Dengan Spektrofotometer UV-Vis
 - a. Pembuatan Larutan AlCl_3 10%

AlCl_3 diambil sebanyak 500 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas [13].
 - b. Pembuatan Kalium Asetat 1 M

Kalium asetat diambil sebanyak 500 mg di larutkan dengan etanol p.a, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 5 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas [13].
 - c. Penyiapan Larutan Kuersetin 400 ppm

Kuersetin diambil sebanyak 20 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a 5 mL. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL dan dicukupkan dengan etanol p.a sampai tanda batas [13].
 - d. Pembuatan Seri Konsentrasi Kuersetin

Seri konsentrasi kuersetin dibuat dengan konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8ppm, 10 ppm, dan 12 ppm dalam 5 mL etanol p.a [13].
 - e. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Penentuan panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan menggunakan pembanding kuersetin. Larutan seri konsentrasi padakadar 6 ppm diambil sebanyak 1000 μL , kemudian ditambahkan 200 μL AlCl_3 10% dan 200 μL CH_3COOK 1M sampai terbentuk warna kuning. Baca pada spektrometer UV-Vis dengan panjang gelombang 400-500 nm [13].
 - f. Penentuan *Operating Time*

Penentuan *operating time* dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan kuersetin sebagai pembanding. Larutan seri pada konsentrai 6 ppm diambil sebanyak 1000 μL kemudian ditambahkan 200 μL AlCl_3 10% dan 200 μL CH_3COOK 1M sampai terbentuk warna kuning. Baca dengan menggunakan spektrometer UV-Vis dengan panjang gelombang 436,2 nm pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 [13].
 - g. Penetapan Kurva Baku Kuersetin

Larutan seri konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm diambil masing masing sebanyak 1000 μL dan ditambahkan dengan AlCl_3 10% sebanyak 200 μL dan CH_3COOK 1M sebanyak 200 μL sampai terbentuk warna kuning. Kemudian larutan ditunggu selama *operating time* 30

menit dan dibaca absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 436,2 [13].

h. Pembuatan Larutan Sampel

Fraksi etil asetat diambil sebanyak 1000 mg, kemudian dimasukkan kedalam beaker glass 50 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a dengan menggunakan *magnetic stirrer* dengan kecepatan 300 rpm sampai terlarut sempurna. Saring dengan menggunakan kertas saring kemudian dimasukkan kedalam labu takar 100mL dan dicukupkan sampai batas. Lakukan replikasi 3 kali [13].

i. Pengukuran Flavonoid Total

Larutan induk ekstrak etanol dan fraksi etil asetat buah kemukus diambil sebanyak 1000 μ L, dan dirambahkan dengan AlCl_3 10% dan CH_3COOK 1M masing-masing sebanyak 200 μ L. Absorbansinya dibaca dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 436,2 nm dan ditunggu selama *operating time* 30 menit. Lakukan replikasi 3 kali [11].

C. Hasil dan Pembahasan

Determinasi dilakukan di Laboratorium Fakultas Biologi UGM. Determinasi tanaman bertujuan untuk mengidentifikasi suatu tanaman yang digunakan pada penelitian untuk menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan. Hasil determinasi ditunjukan nomor surat keterangan determinasi yaitu : 01410968/S.Tb./XI/2021.

Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dari 325 gram serbuk kulit buah sukun diperoleh ekstrak kental sebanyak 60,7 gram. Nilai rendemen ekstrak yang didapat sebesar 17,34%. Fraksinasi ekstrak etanol buah kemukus dilakukan menggunakan pelarut etil asetat dan n-heksan. Fraksinasi dilakukan dengan tujuan memisahkan senyawa flavonoid yang bersifat non polar ke dalam pelarut n-heksan dan semi polar ke dalam pelarut etil asetat. Fase etil asetat yang diperoleh selama proses fraksinasi adalah 8,3 liter. Fraksi kental etil asetat diperoleh dari fraksi cair yang diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 55°C. Fraksi

kental yang dihasilkan dari 180 gram ekstrak adalah sebanyak 42,1 gram dengan nilai rendemen sebesar 23,38%.

Uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus dengan menggunakan metode ABTS. ABTS adalah metode yang paling banyak digunakan untuk sampel tanaman dibandingkan dengan metode DPPH. ABTS merupakan metode mudah diaplikasikan, sederhana, dan fleksibel untuk mengukur aktivitas antioksidan yang bersifat hidrofilik maupun lipofilik dalam ekstrak makanan dan cairan [14]. Prinsip inhibisi digunakan dalam metode ABTS, yaitu penambahan sampel terhadap sistem penghasil radikal bebas dan pengaruh inhibisi terhadap efek radikal bebas diukur untuk menentukan total kapasitas antioksidan dari sampel [15].

Hasil pengukuran panjang gelombang maksimum ABTS diperoleh sebesar 730 nm dan *operating time* menit ke-2. Senyawa trolox digunakan sebagai kontrol positif apakah zat uji bisa menghasilkan efek yang sama dengan sumber antioksidan standar yang digunakan sebagai kontrol positif [16]. Aktivitas penangkalan radikal bebas ABTS dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} merupakan konsentrasi larutan atau sampel yang mampu mereduksi radikal ABTS sebesar 50%. Nilai IC_{50} dapat ditetapkan dengan persamaan regresi linier, menggunakan *microsoft excel*. Hasil yang diperoleh dari persamaan regresi linier yaitu :

Tabel 1. Regresi linier trolox

Replikasi	Regresi linier
1	$Y = 2,5921x - 0,4968,$
2	$Y = 2,6893x - 2,8476$
3	$Y = 2,5425x - 0,4449$

Tabel 2. Regresi linier FEAEEBK

Replikasi	Regresi linier
1	$Y = 0,8761x + 5,821$
2	$Y = 0,8905x + 5,139$
3	$Y = 0,8680x + 6,392$

Hasil persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung nilai IC_{50} , Dimana $y = 50$ dan $x = \text{IC}_{50}$. Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas penangkapan radikal ABTS, sebaliknya nilai IC_{50} yang tinggi maka aktivitas penangkapan radikal ABTS semakin kecil. Berikut hasil nilai IC_{50} trolox, ekstrak etanol buah kemukus dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 3. Nilai IC₅₀ trolox, FEAEEDBK

Replikasi	IC ₅₀ Trolox (µg/mL)	IC ₅₀ FEAEEDBK (µg/mL)
1	19, 481	50, 427
2	19, 651	50, 377
3	19, 841	50, 239
Rata rata	19, 657	50, 347
SD	0,18	0,0971

Berdasarkan hasil yang didapat diperoleh aktivitas antioksidan trolox diperoleh nilai rata-rata IC₅₀ sebesar 19,657±0,18 µg/mL, ekstrak etanol 50,347±0,0251 dan termasuk dalam kategori antioksidan sangat kuat. Hasil uji aktivitas antioksidan trolox lebih kuat dibandingkan FEAEEDBK dikarenakan trolox sebagai pembanding yang sudah terbukti memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Antioksidan dinyatakan sangat kuat apabila nilai IC₅₀ <50 µg/ml, kuat nilai IC₅₀ 50-100 µg/ml, sedang nilai IC₅₀ 100-150 µg/ml, lemah nilai IC₅₀ 150-200 µg/ml, dan sangat lemah nilai IC₅₀ >200 µg/ml [17].

Penetapan kadar fenolik total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Buah Kemukus (*Piper cubeba* L.) dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer. Larutan standar yang digunakan yaitu asam galat. Asam galat akan direaksikan dengan reagen *folin ciocalteu* akan menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa mengandung senyawa fenolik (Kurniawan, 2021). Setelah itu ditambahkan larutan Na₂CO₃ sebagai pemberi suasana basa karena reagen *folin ciocalteu* hanya dapat bereaksi pada suasana basa. Selama reaksi berlangsung, gugus hidroksil pada senyawa fenolik bereaksi dengan *folin ciocalteu* membentuk kompleks molibdenum-tungsten yang berwarna biru yang dapat dideteksi dengan spektrofotometer UV/Vis [19].

Hasil pengukuran panjang gelombang dari larutan standar asam galat diperoleh panjang gelombang maksimal yaitu 743 nm dan *operating time* pada menit ke-105. Pengukuran kurva baku dilakukan untuk menentukan persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung kadar fenolik yang terdapat pada sampel. Berdasarkan data kurva baku maka diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0022x + 0,1093$ dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,9994$. Hasil penetapan kadar fenolik total pada ekstrak

etanol buah kemukus dapat dilihat pada tabel 2. Berdasarkan hasil dapat dilihat bahwa ekstrak etanol memiliki rata-rata kadar 183,0396±0,990 mg GAE/gram sampel.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar fenolik total

Rep	Kadar fenolik (mg GAE/gram)	Rata-rata kadar fenolik (mg GAE/gram) ± SD
1	33, 0324	32,5694 ± 0,4629
2	32, 1065	
3	32,5695	

Penetapan kadar flavonoid total didasarkan pada reaksi kolorimetri yaitu sampel direaksikan dengan AlCl₃ dalam medium asam. Penambahan AlCl₃ pada sampel akan membentuk senyawa kompleks antara aluminium klorida dengan flavonoid kemudian terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah visibel (tampak) ditandai dengan larutan warna menjadi lebih kuning sehingga dapat dibaca pada spektrofotometer UV-Vis [20]. Penambahan kalium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada arah visibel (tampak). Kuersetin digunakan sebagai larutan baku standar karena merupakan senyawa murni, selain itu flavonoid sering ditemukan dalam bentuk glikosida [21].

Hasil pengukuran panjang gelombang dari larutan standar kuersetin diperoleh panjang gelombang maksimal yaitu 430 nm dan *operating time* pada menit ke-25. Pengukuran kurva baku dilakukan untuk menentukan persamaan regresi linier digunakan untuk menghitung kadar flavonoid yang terdapat pada sampel. Berdasarkan data kurva baku maka diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,0519x + 0,1153$ dengan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9997. Hasil penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol buah kemukus dapat dilihat pada tabel 3. Berdasarkan hasil dapat dilihat bahwa ekstrak etanol memiliki rata-rata kadar 5,283 ± 0,0436 mgQE/gram sampel.

Tabel 5. Hasil penetapan kadar flavonoid total

Replik asi	Kadar Flavonoid (mgQE/g fraksi)	Rata-rata kadar flavonoid (mgQE/g fraksi) ± SD
1	5,238	5,283 ± 0,0436
2	5,325	
3	5,286	

D. Simpulan

Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus memiliki aktivitas antioksidan dengan metode ABTS dengan nilai IC₅₀ sebesar 50,347±0,0971 µg/mL. Fraksi etil asetat ekstrak etanol buah kemukus memiliki kadar fenolik total sebesar 32,5694 mgGAE/gram fraksi dan kadar flavonoid total sebesar 5,283 mgQE/gram fraksi.

Pustaka

- [1] A. C. Lalus, F. N., Parera, L. A. M., dan Lalang, "Analisis Kandungan Flavonoid Total Pada Ekstrak Etanol Buah Kelor (*Moringga oleifera* Lamk) Dengan Menggunakan Metode Spektrofotometer UV-Vis," *J. Mat. Ilmu Pengetah. Alam*, vol. 21, no. 1, p. 69, 2021.
- [2] Damayanti, K., Anas, Y., Marlina, W., Nabila, T., dan Irmawati, P., "Aktivitas Antiparkinson Ekstrak Dan Fraksi Buah Kemukus (*Piper Cubeba* L.) Pada Tikus Putih Galur Sprague Dawley. 12(2), 90–98. <https://doi.org/10.22%0A435/Jki.V12i2.5964>," 2022.
- [3] Al-Tememy, T. M. K., "Antibacterial Activity of Piper Cubeba Linn. Fruit Extracts Against Selected Bacterial Pathogens in Basrah City.," *Basrah J. Vet. Res.* 12(1), 142–151. <https://doi.org/10.33762/bvetr.2013.76184>, 2013.
- [4] Nahak, G., dan Sahu, R. K., "Phytochemical Evaluation And Antioxidant Activity of Piper cubeba and Piper nigrum.," vol. 1(8), pp. 153–157., 2011.
- [5] Yuliyanti, M., Husada V. M. S., Fahrudin H. A. A., dan Setyowati W. A. E., "Optimasi Mutu dan Daya Detergensu Sediaan Detergen Cair Ekstrak Biji Mahoni (*Swietenia mahagoni*), Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia.," vol. 4(2), pp. 65–76.
- [6] Faisal, H., 2019, "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L . Moench) dengan Metode DPPH (1 , 1- Difenil-2- Pikrilhidrazil) Dan Metode ABTS.," *Reg. Dev. Ind. Heal. Sci. Technol. Art Life*, vol. Vol 2 (1), pp. 1–5.
- [7] T. Fitriana, W. D., Fatmawati, S., dan Ersam, "Uji Aktivitas Antioksidan Terhadap DPPH Dan ABTS Dari Fraksi-Fraksi," *SNIP Bandung*, p. 658, 2015.
- [8] Aryanti, R., Perdana F., dan Rizkio, R. A. M., "Telaah Metode Pengujian Aktivitas Antioksidan Pada Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze)," *J. Surya Merdeka*, vol. 7, no. 1, pp. 15–24, 2021.
- [9] E. Budiarmo, L., dan Suryanto, "Uji Aktivitas Antioksidan Dari Fraksi Buah Sirih Hutan (*Piper cubeba*) dengan Metode DPPH," *J. Ilm. UNSRAT*, vol. 3, no. 2, pp. 121–126, 2014.
- [10] Amalia, K. R., Sumantri, S., dan Ulfah, M., "Perbandingan Metode Spektrofotometri Ultraviolet (UV) dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (Kckt) Pada Penetapan Kadar Natrium Diklofenak," *J. Ilmu Farm. Dan Farm. Klin.*, pp. 48–57, 2011.
- [11] A. . & S. Puspitasari, "Aktivitas Antioksidan Perasan Jeruk Manis (*Citrus sinensis*) dan Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) menggunakan Metode ABTS.," *Maj. Farm. dan Farmakol.*, vol. 23(2), 2019.
- [12] Sami, F. J., dan Rahimah, S., "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Bunga Brokoli (*Brassica oleracea* L. var. *Italica*) Dengan Metode DPPH (2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan Metode ABTS (2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin)-6-asam sulfonat).," *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 2(2), pp. 107–110.
- [13] R. L. Puspitasari, A.D & Wulandari, "Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*).," *J. Pharmascience*, vol. 04, pp. 167 – 175, 2017.
- [14] I. M. Nur, "Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr.) Dengan Metode ABTS Serta Penetapan Kadar Flavonoid Total.," 2020.
- [15] Wang, Q., Jin, J., Dai, N., Han, N., Han, J., dan Bao, B., "Anti-inflammatory Effects, Nuclear Magnetic Resonance Identification, And High-Performance Liquid Chromatography Isolation Of The Total Flavonoids From *Artemisia Frigida*," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24(2), 2016.
- [16] H. F. Poli, A.R., Katja, D.G., & Aritonang, "Potensi Antioksidan Ekstrak dari Kulit Biji Matoa (*Pometia pinnata* J.R & G. Forst).," *Chem. Prog.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–30, 2022.
- [17] İ. Gulcin, "Antioxidants and Antioxidant Methods: An Updated Overview.," *Arch. Toxicol.*, vol. 94, no. 3, 2020.

- [18] I. T. Kurniawan, K., Pertiwi, A. T., dan Lestari, “Analisa Absorbansi Kadar Flavonoid Total Ekstrak Maserasi Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.),” *Pharm. J. Islam. Pharm.*, vol. 5, no. 1, p. 80, 2021.
- [19] F. Azizah, D. N., Kumolowati, E., dan Faramayuda, “Penetapan Kadar Flavonoid Metode $AlCl_3$ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.),” *Kartika J. Ilm. Farm.*, vol. 2, no. 2, pp. 45–49, 2014.
- [20] A. Anwar, K., Lokana, F.M., Budiarti, “Antioxidant Activity of Dewandaru Leaf (*Eugenia Uniflora* L.) Ethanol Extract and Determination of Total Flavonoid and Phenolic Content,” *J. Ilm. Sains*, vol. 22, no. 2, pp. 161–171, 2022.
- [21] J. B. Harborne, *Metode Fitokimia dan Penuntutan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*,. ITB Press, Bandung, 1987.

Profil Penulis

Nama lengkap : Khoirul Anwar

Tempat tanggal lahir : Pati, 27 November 1995

Pekerjaan : Dosen Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim

Bidang Penelitian : Kimia Farmasi Analisis