

Antioxidant Activity of Dewandaru Leaf (*Eugenia Uniflora L.*) Ethanol Extract and Determination of Total Flavonoid and Phenolic Content

Khoirul Anwar^{1*}, Faridha Maera Lokana²⁾, Aqnes Budiarti¹⁾

¹⁾Departemen Kimia Analisis dan Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim, Semarang, Indonesia

²⁾Program Studi Farmasi, Universitas Wahid Hasyim, Semarang, Indonesia

^{*}Corresponding author: anwarkhoirul174@gmail.com

ABSTRACT

Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) is a plant that has antioxidant activities. The compounds contained phenolic compounds and flavonoids. This study aimed to test the antioxidant activity of the ethanol extract of Dewandaru leaves (*Eugenia uniflora L.*) with ABTS method and determine the content of flavonoid and total phenolic compounds. Ethanol extract of Dewandaru leaves was obtained by maceration using 96% ethanol. The ethanol extract of Dewandaru leaves identified the active compounds by FTIR (Fourier Transform Infra Red) and phytochemical screening. Ethanol extract of Dewandaru leaves was tested for its antioxidant activity using the ABTS method to obtain the IC₅₀ value and determined total flavonoid and phenolic content using UV/Vis spectrophotometry to obtain the levels (mg/g sample). The identification results show that the ethanol extract of Dewandaru leaves is a flavonoid compound of the dihydroflavonol type which has a bound OH functional group, aliphatic CH, C = O, C = C aromatic, C - O and aliphatic CH, and there are hydroxy groups on the C-3, C atoms. -5, and C-7. The results of phytochemical screening showed that the ethanol extract of Dewandaru leaves contains saponins, tannins, phenolics, and flavonoids. The ethanol extract of Dewandaru leaves has antioxidant activity with an IC₅₀ value of 33.92 ppm and trolox with an IC₅₀ value of 19.24 ppm. Based on the IC₅₀ value, both are categorized very strong antioxidant activity. The total phenolic and total flavonoid levels were 327.52 mgGAE/g and 35.65 mgQE/g.

Keywords: Antioxidant; *Eugenia uniflora L.*; flavonoid; phenolic

Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Dewandaru (*Eugenia Uniflora L.*) serta Penetapan Flavonoid dan Fenolik Total

ABSTRAK

Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) termasuk salah satu tanaman yang mempunyai khasiat antioksidan. Senyawa yang terkandung didalamnya antara lain senyawa fenolik dan flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora L.*) menggunakan metode ABTS dan menetapkan kandungan senyawa flavonoid dan fenolik total. Ekstrak etanol daun dewandaru diperoleh dengan cara maserasi menggunakan etanol 96 %. Ekstrak etanol daun dewandaru diidentifikasi senyawa aktif dengan FTIR (Fourier Transform Infra Red) dan skrining fitokimia. Ekstrak etanol daun dewandaru diuji aktivitas antioksidan menggunakan metode ABTS sehingga diperoleh nilai IC₅₀. Selanjutnya ekstrak etanol daun dewandaru ditetapkan kandungan flavonoid dan fenolik totalnya secara spektrofometri UV/Vis hingga diperoleh kadarnya (mg/g sampel). Hasil identifikasi menunjukkan ekstrak etanol daun dewandaru mengandung senyawa golongan flavonoid jenis dihidroflavonol yang mempunyai gugus fungsi OH terikat, CH alifatik, C = O, C = C aromatik, C - O dan CH alifatik, serta terdapat gugus hidroksi pada atom C-3, C-5, dan C-7. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dewandaru mengandung senyawa saponin, tanin, fenolik, dan flavonoid. Ekstrak etanol daun dewandaru memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 33,92 ppm dan trolox dengan nilai IC₅₀ sebesar 19,24 ppm. Berdasarkan nilai IC₅₀ keduanya dikategorikan memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Sedangkan kadar fenolik total serta flavonoid total sebesar 327,52 mgGAE/g dan 35,65 mgQE/g.

Kata kunci: antioksidan; *Eugenia uniflora L.*; fenolik; flavonoid

(Article History: Received 23-10-2022; Accepted 29-10-2022; Published 31-10-2022)

PENDAHULUAN

Pola hidup masyarakat yang tidak baik diantaranya konsumsi makanan dengan nutrisi yang tidak seimbang dan mengandung bahan

kimia berbahaya seperti pemanis, pengawet, pewarna sintetis, kebiasaan merokok, minuman beralkohol, olahraga yang kurang maupun berlebihan dan istirahat yang tidak



cukup dapat berpengaruh buruk terhadap kesehatan. Disamping itu juga kondisi lingkungan yang tidak baik seperti polusi dari asap rokok maupun kendaraan bermotor, paparan radiasi matahari secara berlebihan, serta penggunaan pestisida yang tidak benar juga berdampak negatif bagi kesehatan. Hal tersebut menyebabkan produksi senyawa antioksidan alami yang dihasilkan tubuh mengalami penurunan (Yuslianti, 2018). Bahkan yang terjadi sebaliknya, jumlah senyawa radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh terus meningkat. Kondisi ini disebut *stres oksidatif* yang dapat memicu berbagai penyakit kronis dan degeneratif seperti kanker, penyakit autoimun, penuaan dini, katarak, rheumatoid arthritis, kardiovaskuler dan neurodegeneratif.

BHA (*Butil Hidroksi Anisol*) dan BHT (*Butil Hidroksil Toluen*) merupakan antioksidan sintesis yang sering digunakan oleh masyarakat. Selain itu penelitian terbaru melaporkan bahwa vitamin E sangat penting untuk mencegah penyakit degeneratif seperti penyakit kardiovaskuler. Vitamin C juga dikenal sebagai antioksidan yang berperan dalam menangkal berbagai penyakit degeneratif maupun kronik (Safnowandi, 2022). Namun penggunaan zat-zat tersebut harus dibatasi karena dapat menimbulkan efek samping yaitu kerusakan paru-paru dan hati serta bersifat karsinogenik (Yuslianti, 2018).

Salah satu tanaman di Indonesia yang diketahui berpotensi sebagai antioksidan alami adalah Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) (Santoso *et al.*, 2020). Bagian tanaman yang dapat dimanfaatkan umumnya bagian daun dan buah (Fidelis *et al.*, 2022). Berdasarkan beberapa hasil penelitian diantaranya penelitian Suhendi *et al.* (2011) daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) mengandung senyawa 5,7,3',4'-*tetrahidroksi flavonol* atau kuersetin. Asam elagat, asam galat, rutin terkandung dalam ekstrak air, etanol dan metanol-aseton daun dewandaru (Schumacher *et al.*, 2015) Sedangkan ekstrak metanol, etil asetat dan n-butanol daun dewandaru positif mengandung tanin, flavonoid dan quinon sedangkan ekstrak kloroform mengandung flavonoid (Santoso *et al.*, 2020). Selain itu penelitian (Utami *et al.*, 2018) juga menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dewandaru mempunyai aktivitas antiradikal DPPH yang sangat kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 4,63 $\mu\text{g/ml}$ sedangkan

vitamin E sebesar 8,90 $\mu\text{g/ml}$. Profil fitokimia senyawa yang terkandung dalam daun dewandaru bervariasi tergantung pada iklim, penyimpanan dan persiapan ekstrak (Fidelis *et al.*, 2022).

Penentuan aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan metode ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt). Kelebihan metode ABTS dapat dilarutkan dalam pelarut organik maupun air, sehingga mampu mendeteksi senyawa yang bersifat lipofilik maupun hidrofilik. Selain itu ABTS dapat memberikan absorbansi spesifik pada panjang gelombang *visible* dan waktu reaksi yang cepat. Hasil penelitian Djide *et al.* (2022) bahwa hasil uji aktivitas antioksidan rimpang bangle dalam pelarut etanol 96% memiliki nilai IC_{50} sebesar 25,320 ppm yang tergolong antioksidan sangat kuat dalam meredam radikal bebas ABTS. Hasil penelitian Poli (2022) bahwa pengujian aktivitas antioksidan dengan metode ABTS menunjukkan ekstrak metanol kulit biji mataoa sebesar 93,91%.

Berdasarkan latar belakang maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) serta penetapan kandungan flavonoid dan fenolik totalnya untuk melengkapi data penelitian sebelumnya.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun dewandaru dengan metode ABTS dan menetapkan kandungan senyawa flavonoid dan fenolik total ekstrak etanol daun dewandaru.

METODE PENELITIAN

Bahan uji yang digunakan adalah daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) segar. Pelarut dan bahan yang digunakan etanol 96 % teknis (Merck), aquadest, asam galat, kuersetin (Sigma), Na_2CO_3 , Folin-Ciocalteu, etanol p.a (Merck), FeCl_3 , AlCl_3 (Merck), natrium asetat, serbuk magnesium (Mg), asam klorida (HCl) pekat, ABTS (2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzothiazoline)-6-Sulfonic Acid) p.a (Merck), trolox (Sigma), dan kalium persulfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$).

Seperangkat alat ekstraksi dan uji kualitatif yang terdiri dari alat gelas (Iwaki Pyrex), seperangkat alat maserasi, mesin penyerbuk, timbangan elektrik (Henherr Scale), *moisture balance* (Ohaus), seperangkat

vakum, corong buchner, almari pengering, penguap vakum putar (Heidolph), desikator. Seperangkat alat gelas (Iwaki Pyrex), Spektrofotometer UV-Vis 1800 (Shimadzu), dan mikropipet.

Jalannya penelitian

a. Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) dilakukan di Laboratorim Ekologi dan Biosistemika, Jurusan Biologi Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro Semarang. Proses identifikasi dilakukan mencocokkan bagian tanaman seperti akar, batang, daun, bunga dan biji dari tanaman *peppermint* dengan kunci determinasi tanaman dalam buku Flora of Java karangan.

b. Pembuatan Simplisia Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.)

Daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) segar berasal dari Kelurahan Susukan, Kecamatan Ungaran Timur, Kabupaten Semarang. Daun dewandaru disortir, dicuci kemudian dikeringkan dengan menggunakan lemari pengering pada suhu 50°C sampai kering. Daun yang telah kering diserbuk dengan mesin penyerbuk yang dilengkapi dengan ayakan 60 mesh sehingga diperoleh serbuk daun dewandaru. Kemudian ditimbang bobot simplisia yang dihasilkan.

c. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Dewandaru

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 285 gram serbuk daun dewandaru dimasukkan ke dalam toples lalu ditambahkan 2138 ml pelarut etanol 96%. Toples dilapisi kertas coklat agar terhindar dari cahaya matahari langsung dan ditutup aluminium foil. Proses perendaman selama 3 hari dan dilakukan pengadukan selama 15 menit tiap 8 jam sekali. Setelah 3 hari, dilakukan penyaringan sehingga didapat maserat 1. Ampas dari penyaringan ditambahkan 712 ml pelarut etanol 96% dan dilakukan perendaman ulang (remaserasi) selama 2 hari dan dilakukan penyaringan kembali sehingga didapat maserat 2. Maserat 1 dan maserat 2 diendapkan semalam kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak etanol. Setelah itu dilakukan penimbangan ekstrak kental dan dihitung persentase rendemen yang dihasilkan. Perhitungan rendemen ekstrak

dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Puspitasari *et al.*, 2019):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental yang diperoleh (g)}}{\text{Berat serbuk daun mint (g)}} \times 100\%$$

d. Organoleptik

Parameter organoleptik ekstrak adalah mendeskripsikan bentuk, warna, rasa dan bau (Depkes RI, 2000).

e. Uji Fitokimia

1) Senyawa Fenolik

Sampel ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 50 mg dilarutkan dengan etanol 96 %. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5% b/v dalam etanol. Sampel positif mengandung fenolik ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru, biru kehitaman, biru kehijauan atau menghasilkan intensitas warna yang lebih gelap (Harborne, 1996).

2) Senyawa Flavonoid

Sampel ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dengan etanol kemudian disaring menggunakan kertas saring. Larutan dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan 0,1 mg serbuk magnesium dan 0,4 mL amil alkohol. Kemudian ditambah HCl pekat tetes demi tetes melalui dinding tabung (Harborne, 1996). Sampel mengandung flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah intensif. Jika berwarna kuning jingga menunjukkan adanya flavon, kalkan dan auron.

3) Senyawa Alkaloid

Sampel ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 50 mg kemudian dilarutkan dengan pelarut HCl 2 N kemudian dibagi ke dalam 4 tabung reaksi. Masing-masing tabung dilakukan penambahan pereaksi. Tabung pertama larutan sampel sebagai blangko. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendroff, tabung kedua ditambahkan pereaksi mayer sebanyak 3 tetes dan tabung keempat ditambah 3 tetes pereaksi wagner. Perubahan warna yang terjadi diamati. Reaksi positif akan menghasilkan endapan berwarna jingga (Harborne, 1996).

4) Senyawa Saponin

Ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 1 ml yang sudah dilarutkan dengan etanol 96 % kemudian ditambahkan aquades dalam tabung reaksi. Selanjutnya digojog kuat selama beberapa waktu. Reaksi positif akan terbentuk buih/busa yang stabil dalam waktu ± 15 menit (Harborne, 1996).

5) Senyawa Tanin

Sampel ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 50 mg ditambah 10 ml aquadest panas dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan NaCl 1% dan 1 tetes Gelatin 5%. Sampel mengandung tanin ditunjukkan dengan terbentuknya endapan (Harborne, 1996).

6) Identifikasi Triterpenoid/steroid

Sampel ekstrak etanol daun dewandaru sebanyak 50 mg dilarutkan dengan pelarut yang sesuai yaitu etanol 96 % kemudian ditambah 5 tetes pereaksi Lieberman bouchardat. Perubahan warna diamati. Reaksi positif akan terbentuk warna biru, hijau merah, jingga seiring bertambahnya waktu (Harborne, 1996).

f. Uji Aktivitas Antioksidan

1) Pembuatan Larutan ABTS

Pembuatan larutan stok ABTS, dilakukan dengan cara menimbang serbuk ABTS sebanyak 100 mg dan serbuk kalium persulfat $K_2S_2O_8$ sebanyak 165,6 mg dilarutkan menggunakan etanol p.a. kedua larutan tersebut diambil masing masing dan dicampur dengan perbandingan volume 1:1, kemudian diselubungi dengan aluminium foil agar tidak terkena cahaya, selanjutnya diinkubasi selama 12-16 jam di tempat yang terhindar dari cahaya hingga larutan homogen dan reaksi yang terjadi sempurna (Lee *et al.*, 2004)

2) Penyiapan larutan stok dan pembuatan seri konsentrasi Trolox

Trolox ditimbang sebanyak 10 mg lalu dimasukkan dalam labu takar 10 mL. Trolox dilarutkan dengan etanol p.a hingga larut, dan dicukupkan volumenya dengan etanol p.a sampai tanda batas. Seri konsentrasi dibuat pada konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm, dicukupkan volumenya dalam labu takar 5 mL dengan etanol p.a (Ardiyansah, 2021).

3) Penentuan panjang gelombang maksimal

Penentuan λ maksimal dilakukan dengan cara mencampur 1 ml larutan trolox konsentrasi 15 ppm, dengan 1 ml ABTS, diukur absorbansi larutan pada spektrofotometer UV-Vis dengan rentang panjang gelombang 600- 800 nm (Ardiyansah, 2021).

4) Penentuan *operating time*

Penentuan *operating time* dilakukan dengan cara mencampur 1 ml larutan trolox konsentrasi 15 ppm, dengan 1 ml ABTS, diukur pada menit ke 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, dan 60 pada λ maksimal. Waktu peredaman radikal ABTS yang menghasilkan absorbansi paling stabil dan memberikan serapan paling tinggi merupakan *operating time*. Serapan yang tinggi menunjukkan sampel sudah bereaksi dengan sempurna (Ardiyansah, 2021).

5) Pembuatan larutan uji

Dibuat larutan induk sampel ekstrak etanol daun dewandaru 10.000 ppm. Larutan induk dipipet 1 ml dicukupkan volumenya dalam labu takar 10 ml hingga tanda batas dengan etanol p.a sehingga konsentrasinya menjadi 1000 ppm. Seri konsentrasi dibuat pada konsentrasi 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm dan 150 ppm, dicukupkan volumenya dalam labu takar 5 mL dengan etanol p.a. (Puspitasari *et al.*, 2019)

6) Uji Aktivitas Antioksidan

Larutan trolox konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm, dan larutan stok sampel ekstrak etanol daun dewandaru dengan seri konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm, dipipet masing-masing 1,5 mL dan ditambahkan 1,5 mL larutan ABTS, kemudian diamkan di tempat yang terhindar dari cahaya selama 25 - 35 menit (*operating time*), lalu diukur serapannya dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimal. Besarnya aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus (Ardiyansah, 2021).

g. Penetapan Kandungan Flavonoid Total

1) Pembuatan larutan $AlCl_3$ 10%

$AlCl_3$ (aluminium klorida) ditimbang sebanyak 500 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol p.a, kemudian dicukupkan volumenya pada labu takar 5 ml (Puspitasari *et al.*, 2019).

2) Pembuatan larutan natrium asetat 1 M

Natrium asetat ditimbang sebanyak 500 mg dilarutkan dengan etanol p.a, kemudian dicukupkan volumenya pada labu takar 5 ml (Puspitasari *et al.*, 2019)

3) Penyiapan larutan kuersetin

Kuersetin ditimbang 20 mg dan dilarutkan dengan 5 mL etanol p.a hingga larut. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL dan ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh

konsentrasi larutan kuersetin sebesar 400 ppm. Seri konsentrasi dibuat pada konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm dalam 5 mL etanol p.a (Puspitasari *et al.*, 2017).

4) Penyiapan larutan sampel

Ekstrak etanol daun dewandaru ditimbang 500 mg dimasukkan ke dalam gelas beker 50 mL kemudian dilarutkan dengan etanol p.a hingga larut dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut. Kemudian larutan disaring ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing sebesar 50000 ppm (Puspitasari *et al.*, 2017).

5) Penetapan kadar flavonoid total

Sampel ekstrak etanol diencerkan 250 kali kemudian dipipet 2 mL, ditambahkan 200 μ L AlCl_3 10% dan 200 μ L natrium asetat. Dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks pada menit ke 25-35 setelah pencampuran. Replikasi dilakukan 3 kali. Sebagai pembanding digunakan larutan kuersetin dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, 10, dan 12 ppm.

h. Penetapan Kandungan Fenolik Total

1) Pembuatan larutan Na_2CO_3 7%

Natrium karbonat ditimbang 7 gram dilarutkan dalam 100 mL aquadest pada labu takar hingga tanda batas bawah (Puspitasari *et al.*, 2019).

2) Penyiapan larutan asam galat

Asam galat ditimbang 10 mg dilarutkan dalam etanol p.a hingga 10 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000 ppm dan seri konsentrasi dibuat pada konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm dalam 5 mL etanol p.a (Puspitasari *et al.*, 2019).

3) Penyiapan larutan sampel

Ekstrak etanol daun dewandaru ditimbang 500 mg dimasukkan ke dalam gelas beker 50 mL kemudian dilarutkan dengan etanol p.a hingga larut dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga larut. Kemudian larutan disaring ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi masing-masing sebesar 50000 ppm (Puspitasari *et al.*, 2017).

4) Penetapan kadar flavonoid total

Sampel ekstrak etanol diencerkan 2 kali kemudian dipipet 200 μ L, ditambahkan 400 μ L Folin Ciocalteu didiamkan selama 8 menit,

ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 7%. Dibaca dengan spektrofotometer UV-Vis pada λ maks pada menit ke 100-110 setelah pencampuran. Replikasi dilakukan 3 kali. Sebagai pembanding digunakan larutan asam galat dengan konsentrasi 50, 100, 150, 200, 250, dan 300 ppm.

i. Analisis data

1) Penentuan Aktivitas Antioksidan

a. % inhibisi

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan dengan besarnya hambatan serapan ABTS (% inhibisi) dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Kontrol} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Kontrol}} \times 100\%$$

Keterangan:

Absorbansi kontrol = serapan radikal ABTS 0,1 mM

Absorbansi sampel = serapan sampel dalam radikal ABTS 0,1 mM

b. Nilai IC_{50} (Inhibitor Concentration)

Dari hasil perhitungan didapatkan % inhibisi. Dibuat kurva konsentrasi (ppm) terhadap % inhibisi, kemudian didapat persamaan regresi $y = bx + a$ dimana x konsentrasi IC_{50} (ppm) dan y persentase inhibisi. Nilai IC_{50} dihitung untuk menentukan berapa konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk memiliki kemampuan 50% inhibisi (Santoso *et al.*, 2020). Kategori aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kategori Aktivitas Antioksidan berdasarkan nilai IC_{50} (Molyneux, 2004)

Nilai IC_{50}	Aktivitas Antioksidan
< 50ppm	Sangat Kuat
50-100 ppm	Kuat
100-150 ppm	Sedang
150-200 ppm	Lemah

2) Penentuan Kadar Fenolik Total

Kadar fenolik total diperoleh dari nilai absorbansi masing-masing sampel kemudian diplotkan kedalam persamaan kurva baku asam galat. Nilai yang didapat dikalikan volume total sampel dan dibandingkan dengan bobot penimbangan dengan rumus:

$$\text{Kadar Fenolik Total} = \frac{X \times Fp \times \text{Volume Total Ekstrak}}{\text{Bobot penimbangan (gram)} \times 1000} \text{ (mg/gram)}$$

Keterangan:

Fp = Faktor pengenceran (Puspitasari *et al.*, 2017).

3) Penentuan kadar flavonoid

Kadar flavonoid total diperoleh dari nilai absorbansi masing-masing sampel kemudian diplotkan kedalam persamaan kurva baku kuersetin. Nilai yang didapat dikalikan volume total sampel dan dibandingkan dengan bobot penimbangan dengan rumus:

$$\text{Kadar Flavonoid Total} = \frac{X \times Fp \times \text{Volume Total Ekstrak}}{\text{Bobot penimbangan (gram)} \times 1000} \text{ (mg/gram)}$$

Keterangan:

Fp = Faktor pengenceran (Puspitasari *et al.*, 2017)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tanaman merupakan tahapan awal yang dilakukan untuk memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian, sehingga kesalahan dalam pemilihan tanaman dapat dihindari. Hasil determinasi menyatakan bahwa bahan yang digunakan dalam penelitian adalah benar tanaman dewandaru (*Eugenia uniflora* L.).

Pemanenan daun dewandaru dilakukan pada pagi hari agar senyawa kimia yang terkandung pada tanaman dalam jumlah maksimal. Kemudian dilakukan sortasi basah untuk memisahkan daun dari tangkainya serta memilih daun berwarna hijau, tidak berlubang, tidak berpenyakit dan sehat. Pencucian dilakukan dengan air mengalir untuk memudahkan pembersihan. Pengeringan tahap pertama dengan cara meniriskan pada tampah besar yang di alasi kertas coklat untuk menghilangkan kandungan airnya. Cara ini mudah dilakukan serta ekonomis dan senyawa metabolit pada bahan tidak rusak.

Daun dewandaru ditimbang dan diperoleh berat daun dewandaru segar sebanyak 680 gram. Pengeringan tahap kedua dilakukan menggunakan almari pengering pada suhu 50°C untuk menghindari kerusakan zat aktif. Kemudian dilakukan sortasi kering untuk memisahkan benda-benda asing seperti bagian tanaman yang tidak diinginkan atau kotoran lain (Depkes RI, 2000). Pembuatan serbuk dengan mesin penyerbuk dengan derajat kehalusan 60 mesh. Semakin halus serbuk simplisia maka proses ekstraksi semakin efektif dan efisien (Depkes RI, 2000). Serbuk simplisia daun dewandaru diperoleh berat sebesar 285 gram.

Serbuk dewandaru dicek kadar airnya dan hasil pengukuran yaitu 7.4 % dan telah memenuhi syarat mutu yaitu < 10% (Depkes RI, 2000). Kadar air yang tinggi atau lebih dari 10% dapat memungkinkan serbuk ditumbuhi oleh jamur yang dapat merusak dan mempengaruhi kualitas serbuk. Serbuk kemudian disimpan di tempat yang tertutup rapat sehingga tidak terjadi dekomposisi kandungan senyawa pada serbuk daun dewandaru.

Serbuk simplisia sebanyak 285 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi karena metode ini dapat menarik zat-zat yang berkhasiat baik yang tahan terhadap pemanasan maupun tidak tahan pemanasan (Depkes RI, 2000). Kelebihan metode ini yaitu cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaan lama dan penyariannya kurang sempurna. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% karena merupakan pelarut semi polar sehingga memudahkan penarikan senyawa yang polar dan non polar. Semakin besar nilai tetapan dielektrikum, maka semakin polar suatu pelarut. Nilai tetapan dielektrikum pada pelarut etanol yaitu 24.30 (Yulianthi *et al.*, 2017). Berat ekstrak yang diperoleh sebesar 90.2 gram.

Hasil ekstraksi simplisia daun Dewandaru yang berupa ekstrak kental dilakukan penentuan nilai rendemen ekstrak. Rendemen merupakan rasio berat ekstrak yang dihasilkan dengan berat serbuk simplisia yang diekstraksi. Nilai rendemen menunjukkan banyaknya kandungan senyawa aktif yang tersari di dalam pelarut. Semakin besar nilai rendemen, maka senyawa aktif yang tersari dalam pelarut semakin banyak (Depkes RI, 2000). Pada penelitian didapatkan rendemen ekstrak sebesar 31.65%.

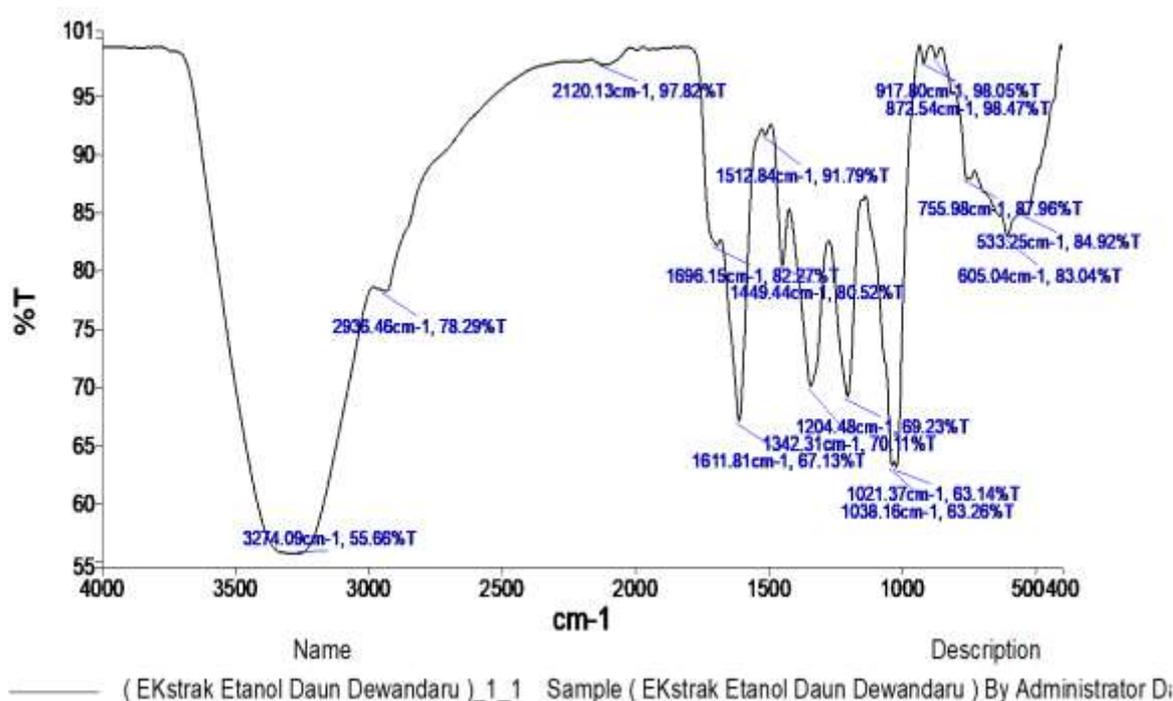
Uji organoleptik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kekhususan bentuk, warna, bau dan rasa dari sampel yang diuji. Hasil uji organoleptik ekstrak etanol daun dewandaru terdapat Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Organoleptik

Organoleptik	Hasil
Bentuk	Ekstrak kental
Bau	Khas
Warna	Hijau Tua
Rasa	Tidak dilakukan

Identifikasi ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan spektrofotometer IR menghasilkan spektra yang disajikan pada Gambar 1, sedangkan data bilangan

gelombang, bentuk pita, intensitas, dan penempatan gugus terkait dipaparkan pada Tabel 3.



Gambar 1. Spektra ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan spektrofotometer IR

Tabel 3. Hasil spektra ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan spektrofotometer IR

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Bentuk pita	Intensitas	Gugus Fungsi
Spektra	Pustaka			
3274,09	3450-3200	Lebar	Kuat	-OH terikat (stretching)
2936,46	2960-2870	Lebar	Kuat	-CH alifatik (-CH ₃ stretching)
1696,15	1820-1600	Lebar	Kuat	-C=O karbonil
1611,81	1650-1450	Tajam	Kuat	-C=C aromatik
1449,44	1500-1400	Tajam	Kuat	-CH alifatik (-CH ₂ bending)
1342,31	1475-1300	Tajam	Kuat	-CH alifatik (-CH ₃ bending)
1021,37	1300-1000	Tajam	Kuat	-C-O alcohol C-C

Pada spektrum inframerah terjadi serapan melebar pada daerah bilangan gelombang 3274,09 cm⁻¹ diduga adalah vibrasi ulur gugus OH yang berikatan hidrogen yang berasal dari alkohol yang diperkuat dengan adanya serapan pada daerah 1021,37 cm⁻¹ karena vibrasi tekuk dari C-O alcohol. Serapan pada daerah 2936,46 cm⁻¹ diduga adalah ciri khas untuk ikatan C-H alifatik (CH₃ dan CH₂ stretching), yang diperkuat dengan munculnya serapan pada daerah 1449,44 cm⁻¹ dan 1342,31 cm⁻¹ yang sama-sama memberikan serapan dengan bentuk pita tajam yang merupakan

serapan CH₂ bending dan CH₃ bending. Gugus dari ikatan C=C aromatik ditunjukkan dengan munculnya serapan pada daerah bilangan gelombang 1611,81 cm⁻¹, serta gugus C=O karbonil dengan serapan tajam pada daerah bilangan gelombang 1696,15 cm⁻¹.

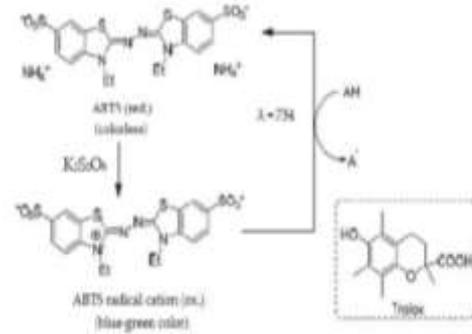
Skrining fitokimia pada penelitian ini bertujuan sebagai uji pendahuluan untuk mengetahui kandungan metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak etanol daun dewandaru. Skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol daun dewandaru belum pernah dilakukan. Pada penelitian ini dilakukan uji

metabolit sekunder terhadap senyawa saponin, tanin, flavonoid, fenolik, alkaloid dan triterpenoid/steroid.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun dewandaru dalam pelarut etanol mengandung senyawa saponin, tanin, flavonoid, dan fenolik. Pada penelitian sebelumnya belum pernah dilakukan skrining fitokimia terhadap ekstrak etanol daun dewandaru. Namun sudah dilakukan skrining terhadap ekstrak daun dewandaru dalam pelarut methanol, n butanol, etil asetat mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid, tanin dan quinon sedangkan pada pelarut n heksan dan kloroform positif mengandung flavonoid (Santoso *et al.*, 2020). Etanol yang merupakan pelarut organik dapat menarik senyawa-senyawa aktif yang semi hingga polar seperti alkaloid, tanin, saponin, steroid, glikosida dan flavonoid (Sa'adah *et al.*, 2015). Skrining fitokimia senyawa fenolik ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan pereaksi FeCl_3 5%. Adanya gugus fenol ditandai dengan terbentuknya warna hijau atau biru kehitaman setelah larutan sampel ditambahkan dengan pereaksi FeCl_3 . Terbentuknya warna hijau atau biru kehitaman disebabkan karena senyawa fenol yang terkandung dalam sampel ekstrak membentuk kompleks dengan ion Fe^{3+} (Harbone, 1996). Skrining fitokimia adanya senyawa flavonoid pada ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan uji shinoda. Identifikasi flavonoid dengan menggunakan serbuk mg, amil alkohol dan HCl pekat menunjukkan hasil positif dengan terbentuknya warna merah jingga pada lapisan amil alkohol (fase atas). Jika terjadi warna merah sampai ungu menunjukkan adanya flavonoid. Jika terbentuk warna kuning jingga menunjukkan adanya flavonoid golongan flavon, kalkon dan auron (Depkes RI, 2000).

Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun dewandaru menggunakan metode ABTS. Prinsip dari metode ABTS adalah penstabilan radikal bebas melalui donor proton, pengukuran aktivitas antioksidan dilakukan berdasarkan penghilangan warna ABTS yang semula berwarna biru hijau akan berubah menjadi tidak berwarna apabila tereduksi oleh radikal bebas. Intensitas warna yang terbentuk kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal. Reaksi senyawa ABTS

dengan zat yang mempunyai aktivitas antioksidan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Reaksi ABTS dan senyawa antioksidan.

Hasil penetapan panjang gelombang maksimal yang diperoleh yaitu 745.50 nm dan hasil penetapan *operating time* didapatkan pada menit ke-30. Penentuan *operating time* dilakukan untuk mengetahui waktu stabil yang dibutuhkan oleh suatu larutan untuk bereaksi (Gandjar, 2015).

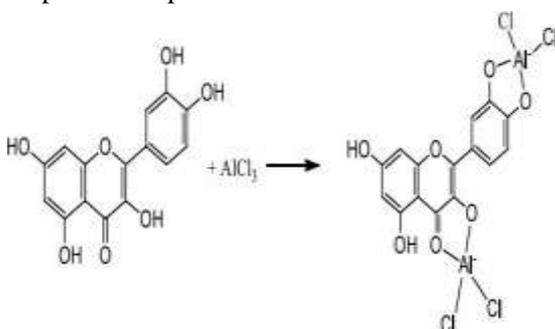
Senyawa trolox digunakan sebagai kontrol positif. Fungsi trolox pada uji aktivitas antioksidan metode ABTS adalah sebagai pembanding apakah zat uji bisa menghasilkan efek yang sama dengan sumber antioksidan standar yang digunakan sebagai kontrol positif. Trolox merupakan antioksidan yang dapat larut dalam air yang merupakan hasil sintesis derivat vitamin E trolox banyak digunakan sebagai standar pembanding dalam berbagai pengujian antioksidan (Setiawan *et al.*, 2018).

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% (Fitriana *et al.*, 2015). Nilai IC_{50} dapat ditetapkan dengan persamaan regresi linier, menggunakan *microsoft excel*. Hasil yang diperoleh dari persamaan regresi linier $y = bx+a$. Dimana $y = 50$ dan $x = \text{IC}_{50}$ (Santoso *et al.*, 2020). 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. Nilai IC_{50} pembanding trolox dan ekstrak etanol daun dewandaru yang diperoleh yaitu sebesar 19.24 ppm dan 33,92 ppm. Keduanya memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (< 50 ppm). Hasil perbandingan nilai IC_{50} trolox dan ekstrak etanol daun dewandaru dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil perbandingan nilai IC₅₀ trolox dan ekstrak etanol daun dewandaru

Sampel	IC ₅₀ (ppm)	Kategori
Trolox	19,24	Sangat kuat
Sampel	33,92	

Penetapan kadar flavonoid total pada penelitian ini menggunakan pereaksi aluminium klorida (AlCl₃) dan natrium asetat. Penambahan aluminium klorida bertujuan untuk membentuk kompleks antara senyawa aluminium klorida dengan gugus keto pada C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 dari golongan flavon dan flavonol (Heliawati, 2018). Sedangkan penambahan natrium asetat bertujuan untuk menstabilkan kompleks antara AlCl₃ dengan kuersetin. Pembentukan kompleks kuersetin dengan aluminium klorida dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Reaksi pembentukan kompleks kuersetin dan AlCl₃

Hasil pengukuran panjang gelombang dari larutan standar kuersetin diperoleh panjang gelombang maksimal yaitu 428 nm dan *operating time* pada menit ke-25. Pada penelitian ini menggunakan kurva baku untuk menghitung kadar flavonoid total ekstrak etanol daun dewandaru yaitu kurva baku yang memiliki nilai koefisien korelasi (r) yang mendekati 1. Nilai koefisien korelasi yang mendekati 1 menunjukkan bahwa kurva tersebut linier sehingga menunjukkan bahwa hukum Lambert-Beer terpenuhi (Gandjar, 2015). Berdasarkan data kurva baku maka diperoleh persamaan regresi linier $y = 0,04930x + 0,13373$ (x= konsentrasi sampel dalam ppm dan y= absorbansi) dan nilai koefisien korelasi $r = 0,996$. Hasil penetapan kadar flavonoid total pada ekstrak etanol daun dewandaru yaitu 35.65 mgQE/g sampel. Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun dewandaru dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun dewandaru

Repli kasi	Abs	Fp	Kadar	Rata-rata Kadar
1	0.486	250	35.73	
2	0.484	250	35.52	35.65
3	0.486	250	35.71	

Penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol daun dewandaru dilakukan secara kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV/Vis. Larutan standar yang digunakan yaitu asam galat, asam galat merupakan senyawa fenolik turunan asam hidroksibenzoat yang tergolong asam fenolik sederhana. Asam galat akan direaksikan dengan reagen *folin ciocalteu* dan akan menghasilkan warna kuning yang menandakan bahwa mengandung senyawa fenolik. 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. Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik, semakin banyak fenolat yang akan mereduksi asam heteropoli (fosfomolibdat-fosfotungstat) menghasilkan kompleks molibdenum-tungstat sehingga warna yang dihasilkan semakin pekat (Alfian et al., 2012). Hasil penetapan panjang gelombang maksimal asam galat diperoleh panjang gelombang sebesar 757,5 nm dan *operating time* 105 menit. Berdasarkan kurva baku diperoleh dengan nilai koefisien korelasi $r = 0,999$ dan persamaan regresi linier $y = 0,0212x + 0,10412$ adalah konsentrasi sampel dan y adalah absorbansi.

Hasil penetapan kadar fenolik total ekstrak etanol daun dewandaru yaitu 327.52 mgGAE/gram sampel. Hal ini menunjukkan bahwa setiap gram ekstrak etanol daun dewandaru terdapat fenolik yang setara dengan 327.52 mg asam galat. Hasil penetapan kadar fenolik ekstrak etanol daun dewandaru dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil penetapan kadar fenolik

Replikasi	Abs	Fp	Kadar (mgGAE/g sampel)	Rata-rata Kadar (mgGAE/g sampel)
1	0,456	100	331,96	327,52
2	0,446	100	322,53	
3	0,452	100	328,06	

KESIMPULAN

Ekstrak etanol daun dewandaru (*Eugenia uniflora* L.) memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 33,92 ppm termasuk kategori sangat kuat yang ditetapkan dengan metode ABTS serta mengandung senyawa fenolik dan flavonoid dengan kadar masing masing yaitu 327,52 mgGAE/g dan 35,65 mgQE/g.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfian, R., & Susanti, H. 2012. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Metanol Kelopak Bunga Rosella Merah (*Hibiscus sabdariffa* L.) dengan Variasi Tempat Tumbuh Secara Spektrofotometri. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, **2(1)**: 73-80.
- Ardiyansah, A. 2021 Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Eceng Gondok (*Eichhornia crassipes*) dengan Metode ABTS Serta Penetapan Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total. Universitas Wahid Hasyim, Semarang.
- Depkes RI. 2000. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.
- Djide, M.N., Mubarak, F. & Natasya, R. 2022. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan Metode ABTS [2,2 azinobis (3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid]. *Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains*, **3(1)**: 28–32.
- Fidelis E.M., Savall, A.S.P., Pereira, F.O., Quines, C.B., & Ávila, D.S. 2022. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) as a source of bioactive compounds for health benefits: A Review. *Arabian Journal of Chemistry*, **15(4)**: 1-22.
- Fitriana, W.D., Fatmawati, S., & Ersam, T. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari Fraksi-fraksi. *Simposium Nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains, Bandung*, 8-9 Juni 2015, 657-660.
- Gandjar, I G., & R.A. 2015. Kimia Farmasi Analisis. Pelajar, Yogyakarta.
- Harborne, J.B. 1996. Metode Fitokimia Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. ITB Press, Bandung.
- Lee, J., Koo, N., & Min, D.B. 2004. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3(1)**: 21–33. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2004.tb00058.x>.
- Molyneux, P. 2004. The Use of The Stable Free Radical Diphenylpicryl-Hydrazyl (DPPH) for Estimating Anti-Oxidant Activity. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, **26(2)**: 211–219.
- Poli, A.R., Katja, D.G., & Aritonang, H.F. 2022. Potensi Antioksidan Ekstrak dari Kulit Biji Matoa (*Pometia pinnata* J.R & G. Forst). *Chemistry Progress*, **15(1)**: 25–30.
- Puspitasari, A.D., Anwar, F.F., & Faizah, N.G.A. 2019. Aktivitas Antioksidan, Penetapan Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan n-Heksan Daun Petai (*Parkia speciosa* Hassk.). *Jurnal Ilmiah Teknosains*, **5(1)**: 1–8. DOI: 10.26877/jitek.v5i1.3490.
- Puspitasari, A.D., & Wulandari, R.L. 2017. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience*, **4(2)**: 167–175. <https://doi.org/10.20527/jps.v4i2.5770>.
- Sa'adah, H., & Nurhasnawati, H. 2015. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbi bawang tiwai (*Eleutherine americana* Merr) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, **1(2)**: 141–153.
- Safnowandi. 2022. Pemanfaatan Vitamin C Alami sebagai Antioksidan pada Tubuh Manusia. *Biocaster: Jurnal Kajian Biologi*, **2(1)**: 6-13.

- Santoso, P., Dewi, N.L.K.A.A. & Adrianta, A. 2020. Antioxidant capacity profile of dewandaru leaf (*extract eugenia uniflora L.*): part of usadha Bali. *International journal of life sciences*, **4(1)**: 87–98. DOI: 10.29332/ijls.v4n1.407.
- Schumacher, N.S.G., Colomeu, T.C., Figueiredo, D.D., Carvalho, V.D.C., Cazarin, C.B.B., Prado, M.A., Meletti, L.M.M., & Z.R.D.L. 2015. Anti-Inflammatory Properties of Aqueous Extract on Diabetes Expression in an Experimental Model of Spontaneous Type 1 Diabetes (NOD Mice). *Antioxidant Journal MDPI*, **4**: 662–680.
- Setiawan, F., Yunita, O., & Kurniawan, A. 2018. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kayu secang dan FRAP. *Media Pharmaceutica Indonesiana*, **2(2)**: 82–89.
- Sri Yulianthi, N.N., Suhendra, L., & Wrsiati, L.P. 2017. Pengaruh Perbandingan Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Total Fenol , α -Tokoferol , dan Total Karotenoid Ekstrak *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*, **5(4)**: 1–10.
- Suhendi, A. Sjahid, L.R., & Hanwar, D. 2011. Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora L.*). *Jurnal Farmasi Indonesia Pharmacon*, **12(2)**: 73–81.
- Utami, W., Da'i, M., Rahayu, V., Sari, P.K., Kusumanegara, D.W., & Rohayati, A. 2018. Aktivitas Antiradikal Berbagai Fraksi dari Ekstrak Etanol dan Ekstrak Etil Asetat Daun *Eugenia uniflora L.* *TM Conference Series*, **1(2018)**: 128-133.
- Yuslianti, E.R. 2018. Pengantar Radikal Bebas dan Antioksidan. Deepublish, Yogyakarta.