

KORELASI KADAR FENOLIK DAN FLAVONOID TOTAL TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN BEBERAPA EKSTRAK DAUN AFRIKA (*Vernonia amygdalina* Delile.) MENGGUNAKAN METODE FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

CORRELATION OF TOTAL PHENOLIC AND FLAVONOID CONTENT AGAINST ANTIOXIDANT ACTIVITY OF SOME AFRICAN LEAVES EXTRACTS (*Vernonia amygdalina* Delile.) USING THE FRAP METHOD (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

Hendy Suhendy¹, Afdal Alif¹, Ira Rahmiyani¹

¹*Kelompok Keahlian Biologi Farmasi, Program Studi S1 Farmasi, Universitas Bakti Tunas Husada,*

**Email Corresponding : radhwa04@gmail.com*

Submitted : 21 Januari 2022

Revised : 28 March 2022

Accepted: 20 April 2022

ABSTRAK

Secara empiris Daun Afrika memiliki potensi antioksidan yang tinggi dengan kontributor utama aktivitas tersebut yaitu senyawa golongan polifenol, sedangkan secara ilmiah ekstrak etanol Daun Afrika termasuk kategori sangat lemah. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan beberapa ekstrak Daun Afrika dan korelasinya dengan kadar fenolik dan flavonoid total. Simplisia diekstraksi dengan maserasi bertingkat menggunakan pelarut yang berbeda kepolaran. Fenolik total dihitung dengan metode pourmorad dengan pembanding asam galat sedangkan flavonoid total menggunakan metode Chang dengan pembanding kuersetin. Aktivitas antioksidan ekstrak diuji dengan metode FRAP menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. Fenolik total ekstrak n-heksana, etil asetat dan methanol daun Afrika berturut-turut sebesar 0,93; 1,30 dan 3,47 g GAE / 100 g, sedangkan flavonoid totalnya sebesar 0,20; 0,58 dan 0,31 g QE / 100 g. Nilai EC₅₀ asam askorbat, ekstrak n-heksana, etil asetat dan methanol daun Afrika berturut-turut sebesar 5,86; 717,50; 740,28 dan 1800,46 µg/ml. Korelasi pearson menunjukkan bahwa nilai Nilai EC₅₀ ekstrak Daun Afrika dipengaruhi oleh fenolik dan flavonoid total (p<0,01) dimana karena rendahnya kadar kedua senyawa golongan tersebut diduga menyebabkan aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak Daun Afrika sangat lemah.

Kata kunci: Antioksidan, Daun Afrika, Fenolik, Flavonoid, Korelasi

ABSTRACT

Empirically, African leaves have high antioxidant potential with the main contributor to this activity being polyphenols while scientifically the ethanolic extract of African leaves is in the very weak category. The objective of this study is to determine the antioxidant activity of some African leaf extracts and its correlation with total phenolic and flavonoid content. Simplicia was extracted by multilevel maceration using solvents of different polarities. Total phenolic was calculated by The Pourmorad method with gallic acid as a standard compound, while total flavonoid was calculated using Chang's method with quercetin as standard compound. The antioxidant activity of the extract was tested by the FRAP method using a UV-Vis Spectrophotometer. Total phenolic extract of n-hexane, ethyl acetate, and methanol of African leaves were 0.93; 1.30, and 3.47 g GAE / 100 g, while the total flavonoids were 0.20;

0.58 and 0.31 g QE / 100 g. The EC_{50} values of ascorbic acid, n-hexane extract, ethyl acetate, and methanol of African leaves were 5.86; 717.50; 740.28 and 1800.46 $\mu\text{g/ml}$. Pearson correlation showed that the EC_{50} value of African Leaf Extract was influenced by total phenolics and flavonoids ($p < 0.01$) where due to the low levels of these two compounds cause the very weak antioxidant activity of the African Leaf extracts.

Keywords: Antioxidant, African Leaf, Phenolic, Flavonoid, Correlation

PENDAHULUAN

Senyawa kimia berbentuk radikal bebas menjadi salah satu penyebab penyakit degeneratif seperti diabetes, kerusakan hati, inflamasi, kanker, gangguan jantung, gangguan syaraf dan proses penuaan (Onkar, Bangar dan Karodi, 2012). Oleh sebab itu, dibutuhkan antioksidan yang dapat membantu melindungi tubuh dari serangan radikal bebas dan meredam dampak negatifnya (Winarsi, 2007). Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat radikal bebas sehingga dapat mencegah penyakit yang disebabkan oleh radikal bebas tersebut (Halliwell dan Gutteridge, 2000).

Salah satu tanaman obat yang memberikan aktivitas antioksidan adalah Daun Afrika seperti pada Gambar 1. Senyawa polifenol pada tanaman ini seperti halnya flavonoid merupakan kontributor utama dari aktivitas tersebut. Adanya flavonoid pada Daun Afrika (*Vernonia amygdalina.*, Delile) ini berfungsi melindungi sel sebagai antioksidan terhadap radikal bebas dan spesies oksigen reaktif seperti hidrogen peroksida yang menyumbangkan atom hidrogennya kepada radikal bebas (Yeap *et al.*, 2010; Ijeh dan Ejike, 2011).



Gambar 1. Tanaman Daun Afrika

Tumbuhan yang mengandung senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid dan fenol berguna sebagai penangkap radikal bebas, yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Nishanthini, Ruba dan Mohan, 2012). Secara empiris disebutkan Daun Afrika memiliki aktivitas antioksidan namun secara ilmiah ekstrak etanol daun Afrika termasuk kategori antioksidan sangat lemah (Dillasamola dan Linda, 2016) sehingga penelitian ini dilakukan untuk menentukan aktivitas antioksidan menggunakan beberapa pelarut ekstraksi yang berbeda dengan etanol dan seperti apa korelasinya dengan kadar fenolik dan flavonoid total.

METODE PENELITIAN

Alat

Lemari pengering simplisia, alat penggiling simplisia (Philips®), cawan uap, tangkrus, desikator, mikropipet 1000 μL , neraca analitik (Pioneer®), rotary evaporator (EYELA OSB-2100), spatula, vial, oven, tanur, batu didih, pipet tetes, botol coklat, labu bundar (Pyrex®), Shake Waterbath (Memmert®), mikroskop optik (Olympus®), kuvet (Agilent®), lampu UV (Camag®), Spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S®) dan alat-alat lain yang lazim digunakan di Laboratorium.

Bahan

Serbuk simplisia Daun Afrika, 2,4,6-tripiryridyl-S-triazina (Sigma Aldrich), NaNO_2 5%, AlCl_3 10%, NaOH 1M, Asam Galat, Na_2CO_3 20%, pereaksi Folin-Ciocalteu (MERCK), Quersetin, pereaksi dragendorff, pereaksi Mayer, HCl pekat, HCl 2N, H_2SO_4 pekat, H_2SO_4

1M, Magnesium, NaCl (10%), FeCl₃ (1%), amoniak (25%), aquades, etanol, *n*-heksana teknis, etil asetat teknis, metanol teknis dan metanol pro analisis, kloroform, kertas saring, amyl alkohol, serbuk Zn, gelatin 1%, vanilin sulfat, pereaksi lieberman burchard, dan lempeng KLT silika gel GF 254 dan 366.

Jalannya Penelitian

1. Determinasi , Pengumpulan dan Pengolahan Bahan Tanaman

Determinasi dilakukan di Herbarium Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Padjajaran, Jatinangor untuk membuktikan kebenaran bahan tanaman. Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile.) yang sudah dikumpulkan kemudian dibersihkan dari kotoran yang melekat pada daun menggunakan air mengalir lalu ditiriskan untuk menghilangkan air sisa-sisa pencucian. Daun yang telah bersih dan bebas air pencucian diangin anginkan selanjutnya dilakukan pengeringan di dalam lemari pengering sampai kering, lalu dilakukan sortasi kering yang berguna untuk membersihkan kembali dari kotoran yang tidak hilang saat pencucian. Simplisia kering tersebut selanjutnya diserbukan dan ditimbang untuk mendapatkan bobot akhir simplisia kemudian disimpan dalam wadah yang kering dan bersih.

2. Karakterisasi dan Penapisan Fitokimia Simplisia

Karakterisasi simplisia dilakukan dengan tujuan untuk menjamin agar simplisia yang diteliti memenuhi persyaratan. Karakterisasi simplisia yang dilakukan diantaranya uji mikroskopik, pengujian kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, kadar air, susut pengeringan, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan kadar abu larut air.

Penapisan Fitokimia simplisia dilakukan terhadap senyawa golongan alkaloid, flavonoid, tannin dan polifenol, kuinon, saponin, mono dan seskuiterpenoid, serta steroid dan triterpenoid.

3. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat dengan sampel serbuk simplisia daun afrika, pelarut yang digunakan adalah pelarut dengan kepolaran bertingkat yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan metanol. Serbuk simplisia yang telah ditimbang 250 – 300 gram kemudian dimaserasi menggunakan *n*-heksan selama 3 x 24 jam sambil sesekali setiap 6 jam diaduk, setelah 24 jam filtrat ditampung dalam wadah. Ampas simplisia dikeringkan dengan cara diangin – anginkan. Setelah residu kering dimaserasi kembali dengan cara yang sama menggunakan pelarut etil asetat dan methanol. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat kemudian dihitung rendemennya.

4. Penapisan Fitokimia Ekstrak

Penapisan fitokimia ekstrak dilakukan terhadap senyawa-senyawa golongan metabolit sekunder seperti halnya pada simplisia.

5. Uji Kualitatif Antioksidan, Senyawa Fenol dan Flavonoid Ekstrak Menggunakan KLT

Masing – masing ekstrak dipantau secara kromatografi lapis tipis dengan menggunakan fase gerak yang sesuai. Plat KLT yang digunakan adalah plat KLT 254 dan 366. Serta digunakan pula penampak bercak H₂SO₄, FeCl₃, Sitroborat, dan FRAP. Sebanyak 10 µL masing – masing ekstrak ditotolkan pada plat KLT. Kemudian di elusi menggunakan fase gerak yang sesuai. Kemudian disemprotkan menggunakan penampak bercak.

6. Uji Kuantitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Menggunakan Metode FRAP

Metode FRAP dibuat dengan menggunakan metode Benzi ini, dalam *buffer* asetat dengan pH 3,6. 2 mL dari masing-masing variasi konsentrasi ditambahkan ekstrak ke dalam 50 µg / mL FRAP. Setelah 30 menit kemudian inkubasi, lalu diukur absorbansi pada λ 597 nm. 50 µg / mL FRAP digunakan sebagai kontrol, *buffer* asetat sebagai balnko, dan asam

askorbat sebagai standar. Analisis dilakukan triplo untuk masing-masing ekstrak dan standar. kapasitas antioksidan ditentukan berdasarkan peningkatan Fe^{2+} - TPTZ absorbansi dengan menghitung persentase kapasitas antioksidan. *Exhibitory Concentration 50%* (EC_{50}) masing-masing ekstrak dapat ditentukan dengan menggunakan kurva kalibrasi (Fidrianny, Suhendy dan Insanu, 2018).

7. Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Afrika

Larutan asam galat dibuat dengan variasi konsentrasi 60 -150 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 0,5 mL larutan asam galat ditambahkan dengan 5 mL Folin Ciocalteu yang telah diencerkan dengan aquabidest (1:10) kemudian ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1 M b/v dalam aquabidest dan dicampur homogen selama 15 menit. *Absorbansi* diukur pada panjang gelombang maksimum 711 nm dengan spektrofotometer. Persamaan kurva baku diperoleh dari regresi linear antara kadar asam galat dengan absorbansi (Pourmorad, Hosseinimehr dan Shahabimajd, 2006).

Masing-masing ekstrak dibuat variasi konsentrasi kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. Sebanyak 0,5 mL larutan uji ditambahkan dengan 5 mL Folin Ciocalteu yang telah diencerkan dengan aquabidest (1:10) kemudian ditambahkan 4 mL Na_2CO_3 1 M b/v dalam aquabidest dan dicampur homogen selama 15 menit. *Absorbansi* diukur pada panjang gelombang maksimum 711 nm dengan spektrofotometer. Fenol total dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi asam galat dan dihitung sebagai asam galat ekuivalen per 100 gram ekstrak (g GAE/100g).

8. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Afrika

Flavonoid total dilakukan dengan menggunakan metode Chang. Penetapan dilakukan secara kolorimetri dengan Spektrofotometri Visible. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak dinyatakan sebagai *Quersetin Equivalent persen* dari persamaan kurva baku quersetin. Quersetin sebanyak 12,5 mg ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam 25 mL metanol p.a untuk 500 $\mu\text{g/ml}$. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi untuk mendapatkan kurva standar. Kemudian seri konsentrasi tersebut ditambahkan dengan metanol hingga 1 mL dan tambahkan 0,1 mL AlCl_3 10 % serta natrium asetat 1 M. Volume akhir ditambahkan aquabidest hingga 5 mL dalam labu ukur. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, *absorbansi* diukur pada panjang gelombang 431 nm. Pengukuran *absorbansi* dibandingkan dengan terhadap blanko. Persamaan kurva baku diperoleh dari regresi linear antara seri konsentrasi kadar quersetin dengan *absorbansi*.

Ekstrak daun afrika 10 mg ditimbang seksama kemudian dilarutkan dalam metanol p.a. kemudian ditambahkan dengan metanol hingga 1 mL dan tambahkan 0,1 mL AlCl_3 10 % serta natrium asetat 1 M. Volume akhir ditambahkan aquabidest hingga 5 mL dalam labu ukur. Setelah diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar, *absorbansi* diukur pada panjang gelombang 431 nm. Larutan sampel dibuat dalam 3 replikasi dan flavonoid total dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi kuersetin dan dihitung sebagai kuersetin ekuivalen per 100 gram ekstrak (g QE/100g)

Analisa Data

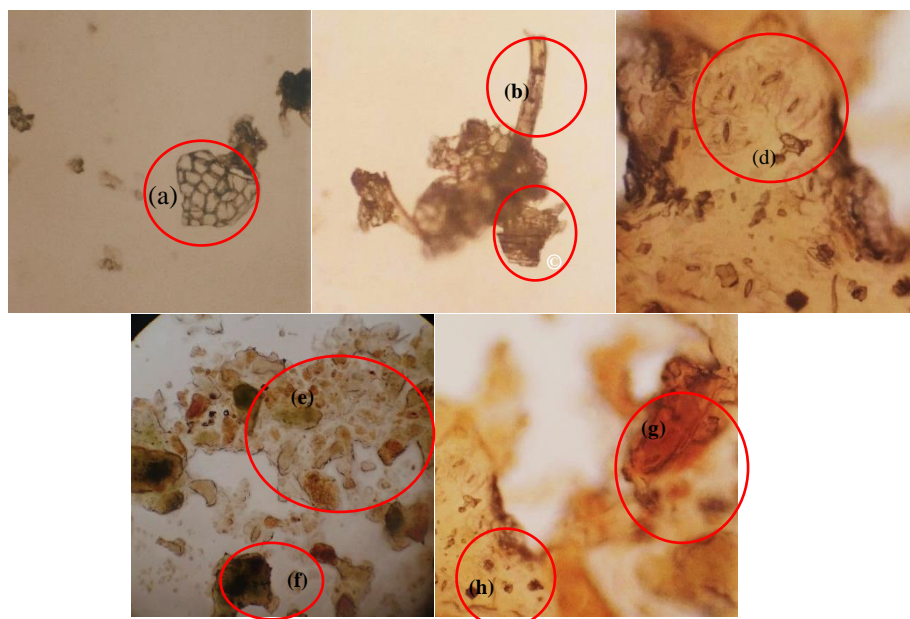
Data EC_{50} yang diperoleh dihitung dan dianalisis secara statistik menggunakan *software* SPSS 16.00 meliputi uji normalitas untuk melihat apakah data terdistribusi normal atau tidak, uji homogenitas untuk melihat data homogen atau tidak, uji ANOVA dengan *post hoc test* uji Tukey untuk melihat apakah data EC_{50} pada masing-masing kelompok memiliki perbedaan yang signifikan atau tidak ($p < 0,05$). Sementara itu untuk melihat hubungan antara kadar total senyawa golongan metabolit sekunder dengan aktivitas antioksidan dilakukan analisis dengan metode *Pearson* ($p < 0,05$) terhadap data EC_{50} , fenolik total dan flavonoid total.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. *Determinasi, Karakterisasi dan Penapisan Fitokimia Simplisia Daun Afrika*

Berdasarkan hasil determinasi tanaman telah dilakukan di Herbarium Laboratorium Taksonomi Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Padjajaran, Jatinangor menunjukkan bahwa sampel yang digunakan adalah tanaman Daun Afrika (*Vernonia amygdalina* Delile) dengan famili Asteraceae.

Pemeriksaan mikroskopik dilakukan terhadap serbuk daun afrika (*Vernonia amygdalina* Delile). Hasil yang diperoleh adanya sel gabus, fragmen penutup tidak berwarna, jaringan pembuluh, stomata anomositik, sel minyak pada epidermis, sel batu eksokarp, kristal oksalat berbentuk roset, dan fragmen kelenjar minyak. Hasil mikroskopik dapat dilihat pada [Gambar 2](#).



Gambar 2. Hasil pengamatan mikroskopik

Keterangan : (a). sel gabus, (b). fragmen penutup tidak berwarna, (c). jaringan pembuluh, (d). stomata anomositik, (e). sel minyak pada epidermis, (f). sel batu eksokarp, (g). fragmen kelenjar minyak dan (h). kristal oksalat berbentuk roset.

Karakterisasi simplisia dan ekstrak dilakukan dengan tujuan untuk menjamin keseragaman mutu bahwa simplisia dan ekstrak yang digunakan sesuai dengan standar ([Depkes RI, 2000](#)). Hasil pemeriksaan parameter simplisia dan ekstrak dapat dilihat pada [Tabel I](#).

Tabel I. Hasil Karakterisasi Simplisia daun Afrika

Parameter Mutu	Rataan Hasil Pengujian (%) \pm SD
Kadar Sari Larut Air	3,70 \pm 0,71
Kadar Sari Larut Etanol	2,60 \pm 0,01
Kadar Air	7,00 \pm 0,00
Susut Pengeringan	8,11 \pm 0,01
Kadar Abu total	5,28 \pm 0,25
Kadar abu tidak larut asam	0,21 \pm 0,07
Kadar abu larut air	3,36 \pm 0,46

Hasil kadar air simplisia yang diperoleh menunjukkan bahwa simplisia Daun Afrika yang digunakan telah memenuhi standar persyaratan. Kadar air maksimal yang diperbolehkan dalam mutu suatu simplisia adalah kurang dari 10% ([Depkes RI, 1995](#)). Kadar air yang baik

dapat menunjukkan ketahanan suatu bahan yang akan disimpan dalam selang waktu yang cukup lama, karena kandungan air di dalam suatu bahan merupakan medium tumbuh bagi bakteri dan mikroorganisme sehingga dapat menyebabkan perubahan kimia pada senyawa aktif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa simplisia daun afrika yang digunakan memiliki kualitas simplisia yang baik.

Penafisan fitokimia pada simplisia dilakukan sebagai analisa awal secara kualitatif kandungan senyawa golongan metabolit sekunder. Penapisan fitokimia yang dapat dilihat pada **Tabel II**, menunjukkan bahwa semua senyawa golongan metabolit sekunder yang diujikan terkandung dalam simplisia.

Tabel II. Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia Daun Afrika

Senyawa golongan metabolit sekunder	Hasil
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Saponin	+
Tanin Polifenol	+
Steroid Triterpen	+
Kuinon	+
Monoseskuiterpen	+

Keterangan: + = terdeteksi dan - = tidak terdeteksi

2. Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi bertingkat agar diperoleh rendemen maksimal senyawa-senyawa metabolit sekunder sesuai sifat kepolarannya. Hasil ekstraksi dikonversi ke dalam persentase rendemen. Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa rendemen paling tinggi terdapat pada ekstrak metanol yang dapat dilihat pada **Tabel III**.

Tabel III. Rendemen Hasil Ekstraksi Simplisia Daun Afrika

Pelarut	Rendemen
n-Heksana	1,524%
Etil Asetat	2,270%
Metanol	18,646%

3. Penapisan Fitokimia Ekstrak Daun Afrika

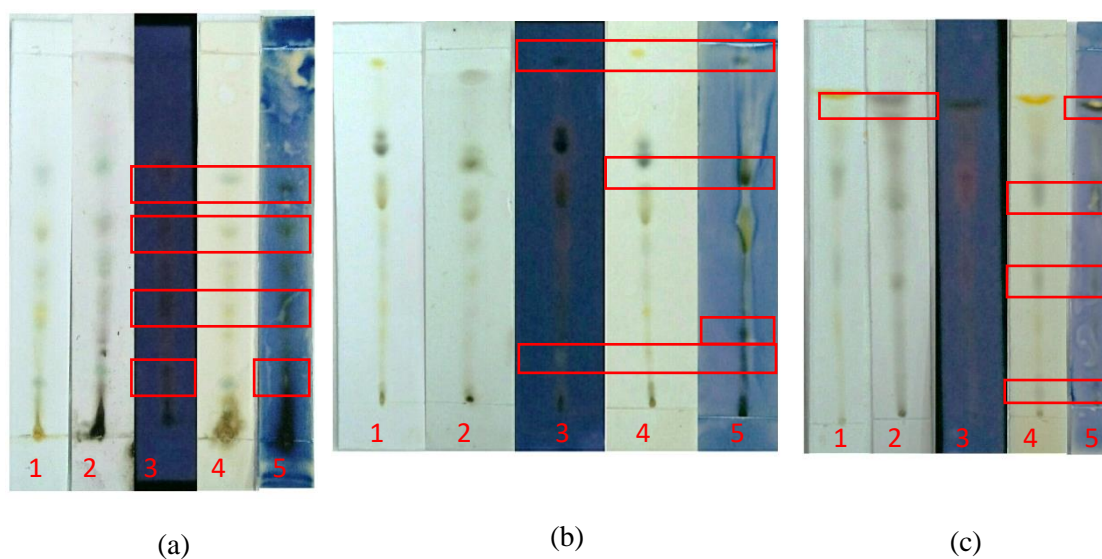
Penapisan fitokimia yang dapat dilihat pada **Tabel IV** menunjukkan ekstrak metanol mengandung seluruh golongan senyawa metabolit sekunder yang diujikan kecuali steroid dan triterpen serta monoseskuiterpen, ekstrak etil asetat menunjukkan adanya senyawa flavonoid, tannin polifenol, dan kuinon dan untuk ekstrak n-heksana menunjukkan adanya senyawa flavonoid, steroid dan triterpen serta monoseskuiterpen. Senyawa-senyawa golongan metabolit sekunder yang terdeteksi pada masing-masing ekstrak terutama flavonoid diduga merupakan senyawa yang memberikan aktivitas antioksidan.

Tabel IV. Hasil Penapisan Fitokimia Beberapa Ekstrak Daun Afrika

Senyawa golongan metabolit sekunder	Ekstrak		
	Metanol	Etil asetat	n-Heksana
Alkaloid	+	-	-
Flavonoid	+	+	+
Saponin	+	-	-
Tanin/Polifenol	+	+	-
Steroid/Triterpen	-	-	+
Kuinon	+	+	-
Monoterpen/seskuiterpen	-	-	+

4. Hasil Pengujian Kualitatif aktivitas antioksidan Ekstrak Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis

Uji kualitatif aktivitas antioksidan seluruh ekstrak dilakukan secara KLT dengan fase gerak ekstrak metanol yaitu n-Heksana : aseton (7:3), ekstrak etil asetat dan ekstrak n-Heksana yaitu n-Heksana : etil asetat (7:3) sedangkan fase diam yang digunakan yaitu plat KLT GF 254. Penampak bercak spesifik yang digunakan yaitu FRAP 0,8%, sitroborat dan besi (III) klorida sedangkan untuk melihat lebih jelas bercak hasil KLT digunakan penampak bercak universal H_2SO_4 . Senyawa-senyawa yang berperan sebagai antioksidan akan menghasilkan bercak berwarna hijau hingga biru setelah disemprot dengan reagen FRAP 0,8%. Senyawa-senyawa fenol akan menghasilkan bercak berwarna biru-hitam setelah disemprot penampak bercak besi (III) klorida. Senyawa-senyawa flavonoid akan memberikan fluoresensi hijau sampai biru terang pada sinar UV 366 nm setelah disemprot penampak bercak sitroborat. Hasil pengujian seperti yang terlihat pada **Gambar 3** menunjukkan bahwa setelah ditarik garis lurus aktivitas antioksidan ekstrak methanol dan etil asetat berasal dari senyawa golongan flavonoid dan fenolik sedangkan aktivitas antioksidan ekstrak n-Heksana berasal dari senyawa golongan fenolik. Hasil dapat dilihat pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Hasil Uji Kualitatif Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Etil Asetat dan n- Heksana Menggunakan KLT GF 254

- Keterangan : = Bercak yang menandakan adanya korelasi dengan penampak bercak antioksidan
- (a) = Ekstrak methanol
 (b) = Ekstrak etil asetat
 (c) = Ekstrak n-Heksana
 1 = Dibawah sinar tampak
 2 = Disemprot dengan H₂SO₄
 3 = Disemprot dengan sitroborat dibawah UV λ 366 nm
 4 = Disemprot dengan besi (III) klorida
 5 = Disemprot dengan FRAP 0,8%.

5. Hasil Uji Kuantitatif Antioksidan Ekstrak Daun Afrika Menggunakan Metode FRAP

Metode FRAP dipilih berdasarkan kemampuan senyawa antioksidan yang tidak hanya dalam hal menangkap radikal bebas namun juga kemampuannya dalam mereduksi ion Fe³⁺ (Yoshino dan Murakami, 1998). Metode ini menggunakan TPTZ-Fe³⁺, kompleks besi ligan 2,4,6-tripiridil-triazin sebagai pereaksi. Kompleks TPTZ-Fe³⁺ yang berwarna kuning akan berfungsi sebagai zat pengoksidasi dan akan mengalami reduksi menjadi TPTZ-Fe²⁺ yang berwarna biru. Dalam reagen FRAP terdapat campuran TPTZ, FeCl₃ dan buffer asetat. Reagen ini yang awalnya berwarna kuning berubah menjadi biru pekat setelah adanya penambahan ekstrak sampel. Perubahan warna ini menandakan terjadinya reduksi ion Fe³⁺ menjadi Fe²⁺ dalam suasana asam. Daya reduksi inilah yang menjadi indikator potensi antioksidan ekstrak. Senyawa yang mempunyai daya reduksi kemungkinan dapat berperan sebagai antioksidan karena dapat menstabilkan radikal dengan mendonorkan elektron atau atom hidrogen sehingga senyawa radikal berubah menjadi lebih stabil (Kim, 2005).

Kurva kalibrasi dibuat untuk menentukan konsentrasi kompleks TPTZ-Fe²⁺ dalam sampel dengan menggunakan standar asam askorbat. Larutan standar asam askorbat digunakan sebagai pembanding karena berfungsi sebagai antioksidan sekunder yaitu menangkap radikal bebas dan mencegah terjadinya reaksi berantai. Asam askorbat termasuk golongan antioksidan sekunder yang mampu menangkal berbagai radikal bebas. Hal itu dikarenakan asam askorbat mempunyai gugus hidroksi bebas yang bertindak sebagai penangkap radikal bebas dan jika mempunyai gugus polihidroksi akan meningkatkan aktivitas antioksidan (Kim, 2005). Hasil absorbansi setiap sampel dimasukkan ke dalam persamaan regresi linier standar asam askorbat, dimana nilai x menunjukkan banyaknya ion Fe²⁺ yang terbentuk. Persamaan regresi linier diperoleh antara konsentrasi dengan persen kapasitas dan konsentrasi ekstrak, dari persamaan ini kemudian dapat ditentukan nilai EC₅₀ dari masing masing ekstrak.

Hasil pengujian pada Tabel V menunjukkan nilai EC₅₀ ketiga ekstrak sangat besar dan berbeda signifikan (P<0,05) dengan asam askorbat. Nilai-nilai EC₅₀ tersebut secara kategori termasuk kedalam aktivitas antioksidan sangat lemah. Lemahnya aktivitas antioksidan disebabkan oleh sedikitnya ion Fe³⁺ yang tereduksi menjadi ion Fe²⁺. Hasil tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun Afrika mempunyai aktivitas antioksidan sangat lemah dengan IC₅₀ 3489,1759 μ g/ml terhadap radikal bebas DPPH (Dillasamola dan Linda, 2016).

Tabel V. Nilai EC₅₀ Beberapa Ekstrak Daun Afrika dan Pembanding Asam Askorbat

Sampel	EC ₅₀ (μ g/ml)
Asam Askorbat	5, 86 \pm 0,00 ^a
Ekstrak Metanol	717, 50 \pm 0,28 ^b
Ekstrak Etil Acetate	740, 28 \pm 1,68 ^b
Ekstrak N Hexane	1800, 46 \pm 27,09 ^c

Keterangan : a-c = huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan bermakna (p<0,05)

6. Hasil Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Daun Afrika

Analisis kandungan total fenolik menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 711 nm. Pengujian dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak daun afrika terhadap antioksidan, tetapi jumlahnya seringkali tidak cukup untuk menetralkan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh. Komponen kimia yang berperan sebagai antioksidan adalah senyawa golongan fenolik dan polifenolik. Senyawa-senyawa golongan tersebut banyak terdapat di alam, terutama pada tumbuh-tumbuhan, dan memiliki kemampuan untuk menangkap radikal bebas (Ramle *et al.*, 2008)

Uji kandungan total fenol dilakukan dengan metode *Folin-Ciocalteu*. Reaksi yang terjadi adalah reaksi reduksi-oksidasi. Senyawa fenolik mereduksi fosfomolibdat fosfotungstat dalam *Folin-Ciocalteu* membentuk *molybdenum* yang berwarna biru. Penggunaan asam galat sebagai standar dikarenakan senyawa ini sangat efektif untuk membentuk senyawa kompleks dengan reagen *Folin-Ciocalteu*, sehingga reaksi yang terjadi lebih sensitif dan intensif (Kiay, Suryanto dan Mamahit, 2011).

Hasil pengujian pada Tabel VI menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) kadar fenolik total antar ekstrak. Total fenolik masing-masing ekstrak berbanding lurus dengan aktivitas antioksidannya. Semakin tinggi kandungan fenol dalam suatu bahan semakin tinggi pula aktivitasnya sebagai antioksidan (Huang, Ou dan Prior, 2005; Nur *et al.*, 2019).

Total fenolik tertinggi dihasilkan pelarut methanol yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa fenolik pada daun afrika lebih larut pada pelarut metanol. Tingginya kandungan fenol yang terekstraksi dalam ekstrak metanol dikarenakan pengaruh pelarut yang digunakan untuk ekstraksi. Pelarut polar seperti metanol merupakan pelarut yang sangat luas digunakan dan efektif untuk ekstraksi komponen-komponen fenolik dari bahan alam (Shahidi, 1997).

Tabel VI. Hasil Pengujian Kadar Fenolik total

Ekstrak	Kadar Fenolik Total (g GAE / 100 g)
n-Heksana	0,933 ± 0,008 ^a
Etil Acetate	1,304 ± 0,038 ^b
Metanol	3,471 ± 0,009 ^c

Keterangan : a-c = huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

7. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Afrika

Analisis flavonoid menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 431 nm. Flavonoid mengandung senyawa aromatik yang terkonjugasi sehingga menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Harborne, 1987). Kuarsetin sebagai larutan standar digunakan karena termasuk senyawa flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Azizah dan Faramayuda, 2014).

Pada pengujiannya larutan sampel ditambahkan $AlCl_3$ yang dapat membentuk kompleks, sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak) yang ditandai dengan larutan menghasilkan warna yang lebih kuning. Penambahan natrium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (tampak) (Chang *et al.*, 2002). $AlCl_3$ akan bereaksi dengan gugus keto pada C4 dan gugus OH pada C3 atau C5 pada senyawa flavon atau flavonol membentuk senyawa kompleks yang stabil sehingga metode ini dapat digunakan untuk menentukan jumlah flavonoid (Anwar dan Triyasmono, 2016).

Absorbansi dari kuersetin yang didapat kemudian diplot terhadap konsentrasi untuk mendapatkan persamaan kurva kalibrasi. Penentuan kadar senyawa flavonoid total pada sampel dinyatakan dalam gram ekuivalen kuersetin tiap 100 gram ekstrak. Hasil pengujian kadar flavonoid total dapat dilihat pada Tabel VII.

Tabel VII. Hasil Pengujian Kadar Flavonoid Total

Kadar Flavonoid Total (g QE / 100 g)	
Ekstrak N Hexane	0,197 ± 0,063 ^a
Ekstrak Etil Acetate	0,584 ± 0,050 ^b
Ekstrak Metanol	0,315 ± 0,007 ^c

Keterangan : a-c = huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Pada tabel tersebut terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) kadar flavonoid total antar ekstrak. Secara angka, kadar total flavonoid masing-masing ekstrak lebih rendah dibandingkan dengan total fenolik karena senyawa flavonoid merupakan sub bagian dari fenolik. Kadar flavonoid total ekstrak mempengaruhi aktivitas antioksidannya. Semakin tinggi total flavonoid maka semakin tinggi pula aktivitasnya antioksidannya (Perwiratami, Suzery dan Cahyono, 2014).

8. Hasil Analisis Data Korelasi Pearson

Korelasi Pearson digunakan untuk menentukan besarnya kontribusi komponen bioaktif pada daun afrika terhadap aktivitas antioksidannya. Hasil pengujian dapat dilihat pada Tabel VIII.

Tabel VIII. Hasil Korelasi Antara Kadar Fenolik Total Dan Flavonoid Dengan Kapasitas Antioksidan

Parameter Antioksidan	Koefisien Korelasi Pearson (R)	
	Fenolik Total	Flavonoid Total
EC ₅₀ FRAP Daun Afrika	-0,627*	-0,707*

Keterangan : * = terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$)

Uji korelasi dilakukan antara kapasitas antioksidan FRAP dengan kadar fenolik dan flavonoid total. Hasil uji korelasi *pearson* pada tabel diatas menunjukkan terdapat hubungan yang negatif dan signifikan ($p < 0,05$) antara kapasitas antioksidan dengan kadar fenolik total maupun flavonoid total. Nilai koefisien korelasi kadar fenolik total yaitu -0.627 dan flavonoid total yaitu -0,707*, artinya semakin besar kadar fenolik dan flavonoid total maka semakin kecil nilai EC₅₀ sehingga bisa dikatakan kapasitas antioksidan pada daun Afrika dipengaruhi oleh adanya kedua senyawa golongan metabolit sekunder ini.

KESIMPULAN

Nilai EC₅₀ ekstrak Daun Afrika dipengaruhi oleh fenolik dan flavonoid total ($p < 0,05$) dimana karena rendahnya kadar kedua senyawa golongan tersebut diduga menyebabkan aktivitas antioksidan ekstrak-ekstrak Daun Afrika sangat lemah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih atas segala dukungannya kepada apt. Ira Rahmiyani, M.Si. selaku Ketua Program Studi S1 Farmasi Universitas Bakti Tunas Husada.

DAFTAR PUSTAKA

- Anwar, K. dan Triyasmono, L. (2016) “Kandungan Total Fenolik, Total Flavonoid, dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.),” *Jurnal Pharmascience*, 3(1), hal. 83–92.
- Azizah, D. N. dan Faramayuda, F. (2014) “Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.),” *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 2(2), hal. 45–49.
- Chang, C. *et al.* (2002) “Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods,” *J Food Drug Anal*, 10(3), hal. 178–182.
- Depkes RI (1995) *Farmakope Indonesia, Edisi IV*. Jakarta: Depkes RI.
- Depkes RI (2000) *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Dillasamola, D. dan Linda, M. (2016) “Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Afrika Selatan (*Vernonia amygdalina* Del.) dengan Menggunakan Metode DPPH (1,1-diphenil-2-picrylhidrazil),” *Jurnal Akademi Farmasi Prayoga*, 1(1), hal. 29–35.
- Fidrianny, I., Suhendy, H. dan Insanu, M. (2018) “Correlation of phytochemical content with antioxidant potential of various sweet potato (*Ipomoea batatas*) in West Java, Indonesia,” *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(1), hal. 25. doi: 10.4103/2221-1691.221131.
- Halliwell, B. dan Gutteridge, J. M. C. (2000) *Free Radical in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press.
- Harborne, J. B. (1987) *Metode Fitokimia*. Bandung: ITB.
- Huang, D., Ou, B. dan Prior, R. L. (2005) “The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays,” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), hal. 1841–1856.
- Ijeh, I. I. dan Ejike, C. E. C. C. (2011) “Current perspectives on the medicinal potentials of *Vernonia amygdalina* Del.,” *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(7), hal. 1051–1061.
- Kiay, N., Suryanto, E. dan Mamahit, L. (2011) “Efek Lama Perendaman Ekstrak Kalamansi (*Citrus Microcarpa*) terhadap Aktivitas Antioksidan Tepung Pisang Goroho (*Musa spp.*),” *Chem. Prog*, 4(1), hal. 27–33.
- Kim, O. S. (2005) “Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Activity of The Vitamin Fraction In rice bran,” *J Food Sci*, 70(3), hal. 208–213.
- Nishanthini, A., Ruba, A. dan Mohan, V. (2012) “Total Phenolic, Flavonoid Contents and In Vitro Antioxidant Activity of Leaf of *Suaeda monoica* Forssk ex. Gmel (*Chenopodiaceae*),” *International Journal of Advanced Life Sciences*, 1(5), hal. 34–43.
- Nur, S. *et al.* (2019) “Korelasi Antara Kadar Total Flavonoid dan Fenolik dari Ekstrak dan Fraksi Daun Jati Putih (*Gmelina arborea* Roxb.) Terhadap Aktivitas Antioksidan,” *Jurnal Farmasi Galenika*, 5(1), hal. 33–42.
- Onkar, P., Bangar, J. dan Karodi, R. (2012) “Evaluation of Antioxidant activity of traditional formulation Giloy satva and hydroalcoholic extract of the *Curculigo orchioides* Gaertn.,” *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6), hal. 2009–2013.
- Perwiratami, C., Suzery, M. dan Cahyono, B. (2014) “Korelasi Fenolat Total dan Flavonoid Total dengan Antioksidan dari Beberapa Sediaan Ekstrak Buah Tanjung (*Mimusops Elengi*),” *Chemistry Progress*, 7(1), hal. 34–38.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J. dan Shahabimajd, N. (2006) “Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Content of Some Selected Iranian Medicinal Plants.,” *Afr J Biotechnol*, 5(11), hal. 1142–1145.
- Ramle, S. F. M. *et al.* (2008) “Study on Antioxidant Activities, Total Phenolic Compound, and Antifungal Properties of Some Malaysian Timbers from Selected Hardwoods Species,” in *International Conference of Environmental Research and Technology*, hal. 472–475.
- Shahidi, F. (1997) *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. Champaign (Ill.): AOCS press.
- Winarsi, H. M. S. (2007) *Antioksidan alami dan radikal bebas*. Jakarta: Kansius.

- Yeap, S. K. *et al.* (2010) "Ethnomedical Used Green Vegetable with Multiple Bio- Activities," *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), hal. 2787–2812.
- Yoshino, M. dan Murakami, K. (1998) "Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization," *Analytical Biochemistry*, 257(1), hal. 40–44.