

Aktivitas Antioksidan dan Penentuan Kadar Total Flavonoid Fraksi Daging Buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt)

Muhammad Zulfian A. Disi^{1*}, Muhammad Fakhrrur Rajih Hi Yusuf², Ismail Rahman³

^{1,2,3} Fakultas Kedokteran, Prodi Farmasi, Universitas Khairun, Jl. Jusuf Abdulrahman Kampus Gambesi, Kota Ternate, Maluku Utara, Indonesia.

* Penulis Korespondensi. Email: zulfianadisi@gmail.com

ABSTRAK

Indonesia adalah negara berkembang dengan keterbatasan dalam penanggulangan kesehatan, di mana penyakit infeksi masih tinggi dan penyakit degeneratif meningkat, sementara flavonoid pada daging buah pala, yang berfungsi sebagai antioksidan kuat, dapat menstabilkan radikal bebas dan menghambat reaksi berantai pembentukannya. Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan total senyawa flavonoid fraksi ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica fragrans* houtt). Jenis penelitian ini berupa penelitian kuantitatif yang di rancang melalui studi eksperimental dengan menggunakan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan spektrofotometri UV-Vis. Hasil dari penelitian ini untuk uji skrining fitokimia didapatkan hasil semua fraksi positif memiliki senyawa Alkaloid, Flavonoid, Steroid, Fenolik, Saponin dan Tanin. Hasil kadar senyawa total flavanoid fraksi n-heksan, 67.18 ± 17.85 , fraksi kloroform 142.55 ± 3.83 , fraksi etil asetat 431.89 ± 36.72 . Hasil aktivitas antioksidan pada fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan rata-rata memiliki nilai IC_{50} yang dikategorikan sangat kuat yaitu fraksi etil asetat $5,760 \mu\text{g}/\text{mL}$ dan fraksi n-heksan $17,719 \mu\text{g}/\text{mL}$, sedangkan pada fraksi kloroform nilai IC_{50} dikatakan kuat yaitu $73,079 \mu\text{g}/\text{mL}$. Kesimpulannya adalah terdapat kadar senyawa total flavonoid yang tinggi terdapat pada fraksi kloroform dan etil asetat sedangkan n-heksan rendah, serta memiliki aktivitas antioksidan dengan kategori sangat kuat, kuat dan lemah.

Kata Kunci:

Antioksidan; Daging Buah Pala; Flavanoid; Fraksi

Diterima:
29-10-2024

Disetujui:
20-12-2024

Online:
26-12-2024

ABSTRACT

Indonesia is a developing country with limitations in addressing health issues, where infectious diseases remain prevalent, and degenerative diseases are on the rise, while flavonoids in nutmeg flesh, functioning as potent antioxidants, can stabilize free radicals and inhibit their chain reaction formation. Research has shown that nutmeg fruit possesses strong antioxidant activity, with phenolic compounds and flavonoids in nutmeg fruit contributing to this antioxidant effect. This study aims to evaluate the antioxidant activity and total flavonoid content of ethanol extract fractions from nutmeg fruit (*Myristica fragrans* Houtt). This is a quantitative study designed through an experimental approach using DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and spectrophotometric methods. Phytochemical screening results showed that all fractions tested positive for Alkaloids, Flavonoids, Steroids, Phenolics, Saponins, and Tannins. The total flavonoid content was measured as follows: n-hexane fraction 67.18 ± 17.85 , chloroform fraction 142.55 ± 3.83 , and ethyl acetate fraction 431.89 ± 36.72 . The antioxidant activity

results indicated that the ethyl acetate and n-hexane fractions had average IC50 values categorized as very strong, with ethyl acetate at 5.760 $\mu\text{g/mL}$ and n-hexane at 17.719 $\mu\text{g/mL}$, while the chloroform fraction had an IC50 value categorized as strong at 73.079 $\mu\text{g/mL}$. In conclusion, high levels of total flavonoids were found in the chloroform and ethyl acetate fractions, with the n-hexane fraction showing lower levels, and the antioxidant activity was categorized as very strong, strong, and weak, respectively.

Copyright © 2024 Jsscr. All rights reserved.

Keywords:

Nutmeg Fruit; Antioxidant; Flavonoid; Fraction

Received:	Accepted:	Online:
2024-10-29	2024 -12-20	2024 -12-26

1. Pendahuluan

Flavanoid adalah suatu metabolit sekunder yang tersebar dalam dunia tumbuhan dan merupakan salah satu golongan senyawa fenol yang terbesar. Flavanoid dan isoflavanoida adalah salah satu golongan senyawa metabolit sekunder yang tersebar secara meluas pada daerah tumbuh-tumbuhan, terdapat pada akar, ranting, bunga, buah, biji dan daun. Senyawa flavanoid banyak ditemukan sebagai zat warna alam berupa warna merah, kuning dan ungu. Warna-warna flavanoid ditimbulkan oleh sistem konjugasi elektron senyawa aromatik tersebut. Kandungan senyawa flavanoid sendiri dalam tanaman sangat rendah, yaitu sekitar 0,25% [1].

Antioksidan berperan untuk menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Antioksidan sangat penting untuk menjaga dan melindungi tubuh dari efek negatif radikal bebas dan menjaga sistem imun tubuh agar tetap terjaga. Secara alami antioksidan dapat dihasilkan tubuh dan juga diperoleh dari luar tubuh yaitu antioksidan alami seperti tanaman daging buah pala (*M. fragrans* Houtt) yang mengandung senyawa antioksidan sangat kuat [2].

Daging buah pala memiliki aktivitas antioksidan kuat berdasarkan penelitian [2] senyawa fenolik dan flavonoid pada daging buah pala memiliki peran dalam meningkatkan aktivitas antioksidan. Berdasarkan hasil penelitian diatas, maka akan dilanjutkan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas antioksidan dan penentuan kadar total flavonoid fraksi daging buah pala (*M. fragrans* Houtt). Pengujian akan dilakukan menggunakan 2 metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) dan Spektrofotometri, penggunaan metode tersebut dipilih karena keduanya sederhana, cepat, dan akurat. Metode DPPH efektif untuk mengukur aktivitas antioksidan melalui reaksi dengan radikal bebas stabil yang diukur berdasarkan perubahan warna, sementara spektrofotometri UV-Vis digunakan untuk menentukan kadar total flavonoid dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang tertentu. Kombinasi kedua metode ini memberikan hasil yang komplementer dan mendalam dalam analisis aktivitas antioksidan dan kadar flavonoid.. Penelitian ini bertujuan untuk mengukur aktivitas antioksidan dan kadar total flavonoid fraksi ekstrak etanol daging buah pala (*M. fragrans* Houtt) menggunakan metode DPPH serta menganalisis hubungan keduanya.

2. Metode

Jenis penelitian ini berupa penelitian kuantitatif yang dirancang melalui studi eksperimental untuk mengetahui aktivitas antioksidan dan perbandingan kadar senyawa total flavanoid fraksi daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt).

Bahan

Aluminium foil, aquadest, asam klorida, asam askorbat, asetat anhidrat, aluminium klorida, besi (III) klorida, bismuth nitrat, etanol 70 %, etil asetat, kalium asetat, kertas saring, kloroform, methanol, n-heksan, pereaksi *mayer*, pereaksi *bouchardat*, pereaksi *dragendrof*, sampel ekstrak daging buah pala, senyawa DPPH, magnesium dan kuersetin.

Pengambilan sampel

Sampel daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) diambil pada pagi hari. Daging buah pala yang diambil adalah buah segar dengan cara dipetik dari batangnya [3].

Pengelolaan sampel

Sampel daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) segar disortasi basah, pencucian, pengeringan dengan cara diangin-anginkan pada suhu ruang kurang lebih 5-7 hari hingga diperoleh simplisia kering kemudian lakukan proses ekstraksi secara maserasi [3].

Ekstraksi (Maserasi)

Proses maserasi dilakukan dengan menimbang sampel sebanyak 500 g dan mengukur pelarut etanol 70% sebanyak 3 liter, kemudian masukan sampel yang telah ditimbang dan pelarut ke dalam wadah. Setelah itu di biarkan selama 3 hari, kemudian setelah 3 hari di pisahkan hasil maserasi dengan sampel dan di uapkan menggunakan hairdryer sampai terbentuk ekstrak kental. Kemudian ekstrak kental di hitung % rendamennya. [4].

Partisi Cair-Cair

Pelarut n-heksana

Menimbang ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica Fragrans* Houtt) sebanyak 5 g ke dalam gelas piala dan larutkan dengan menambahkan akuades hangat sebanyak 50 mL. Setelah larut, dimasukkan ke dalam corong pisah dan tambahkan pelarut n-heksana sebanyak 50 mL, sesekali membuka kran corong pisah untuk dikocok sampai merata. Selanjutnya didiamkan sampai fase air dan fase n-heksana terpisah. Kemudian, fase air dan fase n-heksana dimasukkan ke dalam wadah yang berbeda dan dibagi lagi dengan n-heksana sebanyak 50 mL. Selanjutnya, diuapkan sampai ekstrak kental diperoleh [5].

Pelarut Kloroform

Setelah menimbang 5 gram ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica Fragrans* Houtt) dan dimasukkan ke dalam gelas piala, larutkan dengan menambahkan 50 mililiter akuades hangat. Setelah larut, masukkan ke dalam corong pisah dan tambahkan pelarut kloroform sebanyak 50 mililiter, dikocok sampai merata dengan sesekali membuka kran corong pisah. Kemudian didiamkan sampai fase air dan fase n-heksana terpisah. Setelah itu, fase air dan fase kloroform dikumpulkan di dalam wadah yang berbeda. Fase air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan dibagi lagi dengan kloroform sebanyak 50 mL. Setelah itu, diuapkan sampai ekstrak kental dihasilkan [5].

Pelarut Etil Asetat

Menimbang ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica Fragrans* Houtt) sebanyak 5 g ke dalam gelas piala dan larutkan dengan menambahkan akuades hangat sebanyak 50 mL. Setelah larut, dimasukkan ke dalam corong pisah dan tambahkan pelarut etil asetat sebanyak 50 mL, sesekali membuka kran corong pisah untuk mengocoknya sampai merata. Selanjutnya didiamkan sampai fase air dan fase etil asetat terpisah. Fase air dan fase etil asetat yang terpisah kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang berbeda. Lalu diuapkan [5].

Uji Aktivitas Antioksidan

Pembuatan Larutan DPPH 0,5 mM

Timbang serbuk DPPH 0,02 gram dan campurkan ke dalam labu ukur 100 mL dengan methanol. Selanjutnya, cukupkan dengan metanol sampai tanda batas volume 100 mL (DPPH 0,5 mM) [6].

Penentuan Panjang Gelombang

Larutan DPPH sebanyak 2 mL masukan ke dalam tabung reaksi dengan ditambahkan metanol sebanyak 2 mL, dihomogenkan dengan menggunakan vortex hingga homogen kemudian di inkubasi 30 menit lalu diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis [6].

Pembuatan Larutan Standar

Dalam tabung reaksi, larutan DPPH 0,5 mM sebanyak 2 mL dimasukkan dan ditambahkan metanol sebanyak 2 mL. Dengan vortex, campuran dihomogenkan sampai sempurna. Setelah itu, diinkubasi dalam ruangan gelap selama 30 menit (Taupik et al., 2022).

Pembuatan Larutan Vitamin C

Dalam labu ukur 50 mL, 50 mg serbuk vitamin C ditimbang dan dicampur dengan metanol. Metanol ditambahkan sampai tanda batas. 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm digunakan untuk membuat larutan seri konsentrasi. Mengambil 2 mL dan memasukkannya ke dalam vial untuk mengukur serapan larutan uji pembanding. Kemudian, larutan DPPH 0,5 mM ditambahkan sebanyak 2 mL, dan dikocok dengan vortex. Larutan diinkubasi selama 30 menit di ruang gelap. Selanjutnya, panjang gelombang DPPH diukur [6].

Pembuatan Larutan Uji

Pembuatan induk 1000 ppm

Sebanyak 50 mg ekstrak fraksi n-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat daging buah pala ditimbang, kemudian dilarutkan dengan metanol dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL. Volume ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas pada labu ukur [6].

Pembuatan larutan uji seri konsentrasi 5ppm, 10ppm, 15ppm, 20 ppm dan 25ppm.

Dalam labu ukur 10 mL, larutan induk dari fraksi n-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) masing-masing dipipet dalam volume 50, 100, 150, 200, dan 250 μ L. Larutan ini kemudian ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas pada labu ukur [6].

Pengukuran serapan dengan menggunakan sprktrofotometer UV-Vis

Dalam tabung reaksi yang berbeda, larutan uji 2 mL dari fraksi n-heksan, fraksi kloroform, dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) dimasukkan. Larutan ini kemudian dikocok dengan vortex hingga homogen dan diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selain itu, serapan diukur pada panjang gelombang 517 nm [6].

Penetapan Kadar Total Flavanoid

Pembuatan Larutan Uji Alumunium Klorida ($AlCl_3$)

Untuk membuat larutan uji, 1 g serbuk $AlCl_3$ ditimbang, dilarutkan dengan sebagian akuades dalam beaker gelas, dan kemudian encerkan dengan akuades pada labu takar hingga 10 mL [7].

Pembuatan Larutan Kalium Asetat (CH_3COOK)

Untuk membuat larutan kalium asetat (CH_3COOK), timbang 1 g, campurkan sebagian akuades ke dalam beaker gelas, dan kemudian encerkan dengan akuades pada labu takar hingga 10 mL [8].

Pembuatan Larutan Blangko

Untuk membuat larutan blangko, masukan metanol p.a. sebanyak 3 mL, CH_3COOK 1 M 2 mL, dan $AlCl_3$ 10% 2 mL dipipetan. Kemudian, encerkan dengan akuades pada labu takar hingga 10 mL [8,9].

Pembuatan Larutan Baku Induk Kuersetin

Untuk membuat larutan baku induk kuersetin, timbang 50 mg baku kuersetin standar dan campurkan dengan sebagian metanol dalam labu ukur 50 mL. Kemudian, tambahkan metanol hingga ada tanda batas [9].

Pembuatan Larutan Baku Kerja Kuersetin

Untuk membuat larutan baku kerja, ambil 0,05 mL dari larutan baku induk dan masukkan ke dalam labu ukur 10,0 mL. Kemudian, tambahkan 0,2 mL AlCl₃ 10%, 3 mL etanol 70%, 2 mL CH₃COOK 1M, dan akuades sampai tanda batas [9].

Penentuan Operating Time

Diukur Absorbansi larutan baku kerja kuersetin 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm diukur dengan interval waktu 5 menit dan panjang gelombang maksimum teoritis 428 nm dari 0 hingga 40 menit. Kurva hubungan antara absorbansi, waktu, dan nilai operasi diperoleh diamati [9].

Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan running kuersetin memiliki panjang gelombang maksimum 400–800 nm, yang digunakan untuk mengukur serapan sampel [10].

Penentuan Seri Kurva Baku

Untuk membuat seri kurva baku, larutan baku 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, dan 10 ppm dari larutan baku induk dibuat. Kemudian, larutan baku induk dipipet menjadi 0,02 mL, 0,04 mL, 0,06 mL, 0,08 mL, dan 0,10 mL, masing-masing dimasukkan ke labu ukur 10,0 mL. Ditambahkan ke larutan adalah 3 mL etanol 70%, 2 mL AlCl₃ 10%, dan 2 mL CH₃COOK 1 M. Aquades digunakan untuk menambah volume terakhir hingga ada tanda batas. Setelah operasi time pada panjang gelombang maksimal, larutan siap diukur dengan spektrofotometer UV-Vis. Serapan larutan baku diukur pada panjang gelombang terpanjang mulai dari yang terkecil [9].

Penetapan kadar total flavanoid

Untuk mengetahui kadar total flavonoid sampel fraksi n-heksana, kloroform, dan etil asetat sebanyak 5 mg ditimbang, kemudian diencerkan dengan akuades hingga 5 mL. Kemudian, dalam pipet 1 mL, tambahkan metanol p.a. 3 mL, larutan AlCl₃ 2 mL, dan CH₃COOK 1M 2 mL, dan kemudian tambahkan akuades hingga 10 mL. Larutan didiamkan sampai waktu operasi selesai dan pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV [11].

Analisis Data

Persamaan regresi linier menggunakan *microsoft excel* digunakan untuk menghitung absorbansi dan mengetahui persamaan garis antara absorbansi dengan konsentrasi kuersetin. Rumus persamaan regresi linier adalah sebagai berikut:

$$Y = bx + a$$

Keterangan :

y = absorbansi atau garis regresi

a = slope

b = intersep

x = variabel bebas

Absorbansi sampel diplotkan pada persamaan regresi linier sehingga diperoleh kadar flavonoid total pada sampel. Rumus penentuan kadar total flavonoid (%)

$$F = \frac{C \times V \times Fp}{m} \times 100\%$$

Keterangan :

C = konsentrasi kuersentin (ppm atau mg/1000 ml)

V = volume total ekstrak (mL)

Fp = faktor pengenceran

m = berat sampel (mg)

Rumus penentuan aktivias antioksidan

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{\text{Absorbansi kontrol} - \text{Absorbansi sampe uji}}{\text{Absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Inhibitory Concentration (IC50) adalah konsentrasi zat uji yang dapat menghambat aktivitas radikal bebas (DPPH) hingga 50%. Untuk memperoleh nilai IC50 dihitung berdasarkan presentase inhibisi terhadap radikal DPPH dari masing- masing konsentrasi larutan sampel berdasarkan rumus diatas. Dari nilai % Inhibisi pada berbagai konsentrasi, selanjutnya dimasukkan ke dalam persamaan regresi dengan konsentrasi sampel sebagai sumbu x dan % inhibisi sebagai sumbu y. Nilai IC50 didapat dari perhitungan pada saat % inhibisi sebesar 50% dari persamaan $y = a + bx$ [12]

3. Hasil dan Pembahasan

Sampel dilakukan diambil pada daerah Kota Ternate Selatan kelurahan Jambula. Bagian tanaman yang dipakai pada penelitian ini adalah daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt). Kemudian dilakukan pengambilan sampel, dilakukan sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan dan selanjutnya disortasi kering. Berat masing-masing simplisia kering sebanyak 500 gram. Hasil ekstraksi menggunakan metode maserasi dari berat sampel 500 gram, dengan volume pelarut 3000 mL kemudian didapatkan berat ekstrak kental sebesar 65,9 gram dapat dilihat pada tabel 1 berikut.

Tabel 1. Hasil Ekstrak Etanol 70% Daging Buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt)







Sampel	Berat Simplisia (g)	Volume Pelarut (mL)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)
Daging buah Pala	500	3000	65,9	13,18

Ekstraksi dilakukan melalui teknik maserasi. Tujuan memilih metode maserasi adalah karena metode ini sudah memiliki kemampuan untuk menarik senyawa metabolit sekunder sebanyak mungkin dari sampel. Metode ini tidak membutuhkan pemanasan, yang merupakan keuntungan besar. Ini memungkinkan zat aktif dalam sampel tidak mudah rusak oleh beberapa faktor seperti suhu atau senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan [13].

Ekstrak daging buah pala yang diperoleh dihitung persentase rendemennya. Semakin besar nilai rendemen menunjukkan besar ekstrak yang dihasilkan semakin banyak. Berat ekstrak kental sebesar 65,9 gram. Berdasarkan hasil % rendemen terlihat bahwa hasilnya memenuhi syarat karena menurut Farmakope Herbal Indonesia 2017 persentase rendemen dikatakan baik jika nilainya tidak kurang dari 10%. Menurut Atmaja (2017) ekstrak kental yang telah diperoleh persen rendemennya diukur untuk menentukan jumlah ekstrak kental .

Hasil penapisan fitokimia dilakukan menggunakan beberapa pereaksi warna. Didapatkan hasil skrining ekstrak etanol daging buah pala memiliki senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tanin dan steroid. Berikut tabel 2 hasil penapisan fitokimia.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Daging Buah Pala

Uji Parameter	Penambah Pereaksi	Hasil Skrining	Hasil Warna	Gambar
Alkaloid	0,5 mL Hcl 2N + Pereaksi Mayer	Positif (+)	Terbentuk endapan putih	
	0,5 mL Hcl 2N + Pereaksi Dragendorf	Positif (+)	Terbentuk endapan kuning jingga	
	0,5 mL Hcl 2N + Pereaksi Buchardat	Positif (+)	Terbentuk endapan coklat kemerahan	
Flavonoid	Serbuk Mg + HCl Pekat	Positif (+)	Terbentuk warna jingga dan merah	
Fenolik	FeCl ₃ 2 tetes	Positif (+)	Terbentuk warna hitam	
Saponin	Aquadest	Positif (+)	Terbentuk Buih 2 cm	
Tanin	FeCl ₃ 3 tetes	Positif (+)	Terbentuk warna hitam	
Steroid	H ₂ SO ₄ pekat	Positif (+)	Terbentuk cincin	

Uji skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa metabolit yang bermanfaat. Hasil uji skrining fitokimia dilihat pada tabel 2 positif terkandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tanin dan steroid pada ekstrak ekstrak etanol 70% daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) yang memiliki sifat sebagai antioksidan. Pengujian skrining dilakukan dengan memasukkan pereaksi dan melihat warna dan juga endapan yang muncul sehingga dapat diketahui hasil berdasarkan pereaksi yang digunakan. Hasil yang didapatkan pada tabel 2 sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Nasir (2012) [12] dengan hasilnya yang didapat sama yaitu bahwa daging buah pala memiliki kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, tanin dan steroid [14].

Hasil fraksinasi ekstrak etanol 70% daging buah pala (*Miristica fragras* Houtt) dipakai beberapa pelarut yang memiliki kepolaran berbeda antara lain: n-heksan, kloroform dan etil asetat didapatkan hasil ekstrak fraksi sebagai berikut pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Partisi Cair-Cair Ekstrak Etanol 70% Daging Buah Pala

Sampel	Ekstrak Fraksi	Berat Fraksi (gram)	% Rendemen
Daging Buah Pala	Fraksi N-Heksan	0,67	13,4
	Fraksi Kloroform	0,60	12,0
	Fraksi Etil Asetat	0,59	11,8

Fraksinasi (ekstraksi cair-cair) dengan beberapa pelarut yang memiliki kepolaran berbeda Dimana digunakan pelarut n-heksan, kloroform dan etil asetat. Hasil % rendemen fraksi dapat dilihat pada tabel 3 dimana % rendemen ketiga fraksi memiliki % redemen yang baik yaitu lebih dari 10% sesuai dengan syarat menurut Farmakope Herbal Indonesia 2017, persen rendemen dikatakan baik jika nilainya tidak kurang dari 10%. Uji KLT dipakai 1 perbandingan eluen yaitu n-heksan:etil asetat (5:5). Dalam fraksi daging buah pala yang memiliki manfaat sebagai antioksidan yang dilihat dalam nilai Rf dari fraksi tersebut. Hasil dapat dilihat pada tabel 4 berikut.

Tabel 4. Hasil Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Daging Buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt)

Sampel	Fase Gerak	UV 254 nm	UV 366	Nilai Rf
Fraksi N-heksan	etil asetat:N-heksan (5:5)	Adanya bercak noda	(+) Flavanoid	0,73 cm
Fraksi Kloroform	etil asetat:N-heksan (5:5)	Adanya bercak noda	(+) Alkaloid	0,68 cm
Fraksi Etil Asetat	etil asetat:N-heksan (5:5)	Tidak terdapat noda	-	-

Berikut hasil uji kualitatif dengan KLT dapat dilihat pada gambar sebagai berikut dibawah gambar 1 dan gambar 2. Uji pendahuluan secara kualitatif bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat senyawa metabolit dalam ekstrak daging buah pala yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Hasil yang didapat dalam uji kromatografi lapis tipis dengan menggunakan lampu UV 254 nm didapatkan pada fraksi n-heksan adanya bercak noda berwarna pink yang menandakan senyawa flavonoid dan didapat nilai Rf 0,73.



(a)



(b)

Gambar 1. Fraksi N-heksan, (a) Sebelum disemprotkan DPPH; (b) Setelah disemprotkan DPPH

Fraksi kloroform terdapat bercak noda berwarna kuning yang menandakan senyawa alkaloid dengan nilai Rf 0,68. Pada fraksi etil asetat tidak terdapat bercak noda dan nilai Rf. Pada fraksi sampel fraksi n-heksan dan kloroform daging buah pala menunjukkan hasil positif memiliki aktivitas sebagai antioksidan setelah dilakukan penyemprotan larutan DPPH 0,5 mM dan terjadi perubahan warna dari ungu menjadi kuning. Terjadi perubahan warna menjadi kuning disebabkan dengan adanya senyawa metabolit dari kedua fraksi yang dapat mendonorkan atom hidrogen, sehingga menyebabkan molekul pada radikal DPPH dapat tereduksi dengan ditandai perubahan warna ungu menjadi kuning.

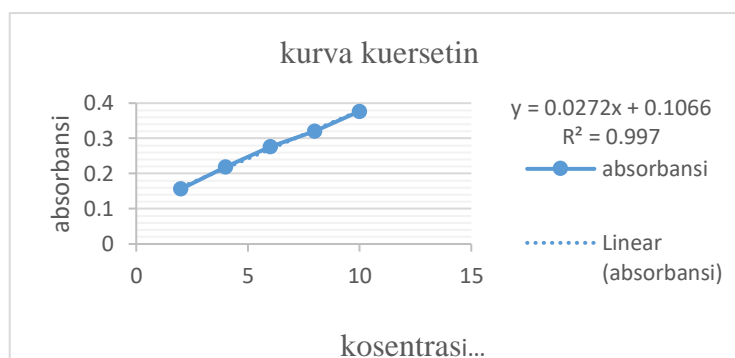


Gambar 2. Fraksi Kloroform, (a) Sebelum disemprotkan DPPH; (b) Setelah disemprotkan DPPH

Hasil Penetapan Kadar Total Flavanoid Fraksi Daging Buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt) pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil Absorbansi Larutan Kuersetin

Panjang Gelombang	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
434 nm	2	0,156
	4	0,219
	6	0,276
	8	0,321
	10	0,377



Gambar 3. Kurva Baku Standar Kuersetin

Pada perlakuan ini diperoleh hasil absorbansi yang dimasukkan kedalam kurva didapat nilai $Y = 0,0272x + 0,1066$ dan nilai $R^2 = 0,997$ (gambar 3). Hasil tersebut sesuai dengan yang tercantum pada hukum lambert-beer rentang nilai Y harus pada rentang 0,2-0,8.

Hasil operating time yang didapatkan yaitu pada menit ke-30. Hal ini sesuai dengan beberapa literatur yang mengatakan bahwa menit ke-30 yaitu waktu yang dibutuhkan kuersetin agar dapat bereaksi dengan $AlCl_3$ dan membentuk kompleks kuersetin yang stabil [15].

Tabel 6. Hasil Kadar Total Flavanoid Fraksi Daging Buah Pala (*Myristica fragrans* Houtt) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis

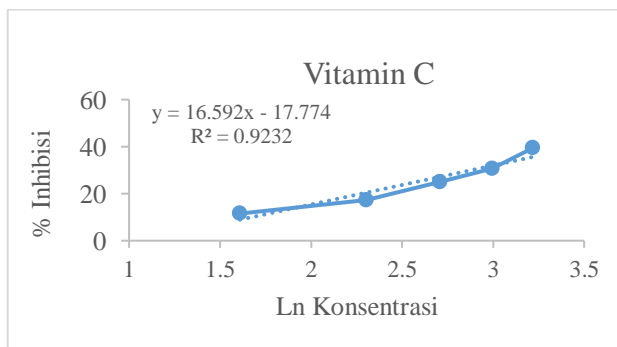
No	Sampel	fraksi	kadar total flavonoid (mg/gr ekstrak) \pm SD
		n-heksan	67.18 \pm 17.85
1.	Daging Buah Pala	kloroform	142.55 \pm 3.83
		Etil asetat	431.89 \pm 36.72

Hasil pengukuran kadar total flavonoid pada fraksi daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki kadar flavonoid tertinggi, diikuti oleh fraksi kloroform, sementara fraksi n-heksan memiliki kadar flavonoid terendah (tabel 6). Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antioksidan secara kuantitatif pada fraksi daging buah pala sebagai larutan uji dan vitamin C sebagai control dalam uji aktivitas antioksidan, hasil dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Hasil Aktivitas Antioksidan vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Inhibisi	Ln IC ₅₀	IC ₅₀
5		0,092	11,538		
10		0,086	17,308		
15	0,104	0,078	25,000	1,942	6,975
20		0,072	30,769		
25		0,063	39,423		

Berikut grafik regresi linier aktivitas antioksidan sampel kontrol vitamin C dapat dilihat pada gambar 3 berikut.



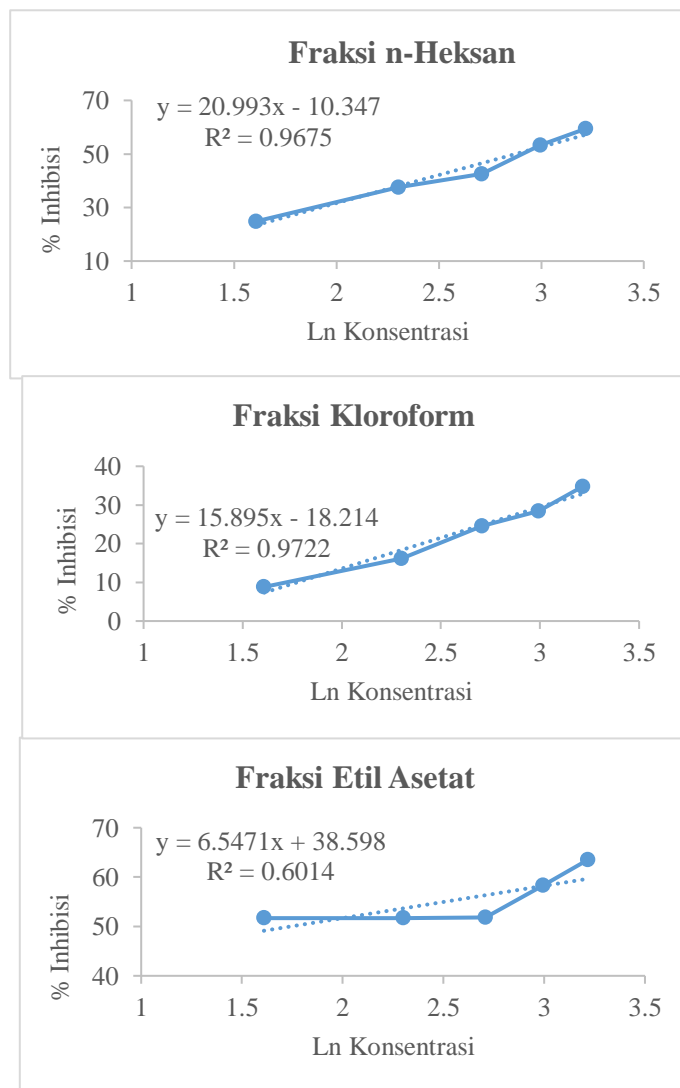
Gambar 3. Grafik regresi linier aktivitas antioksidan Vitamin C

Digunakan vitamin C sebagai pembanding hal ini dikarenakan vitamin C termasuk salah satu jenis antioksidan yang efektif memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang tinggi dan lebih polar daripada vitamin lain. Pada uji aktivitas vitamin C didapatkan dari persamaan regresi linier kemudian dihitung nilai IC₅₀ dengan menggunakan *MicrosoftExcel* dan didapatkan hasil perhitungan IC₅₀ yaitu 6,975µg/mL yang termasuk kategori aktivitas antioksidan sangat kuat karena berada pada rentan konsentrasi kurang dari <50 µg/mL. Sehingga vitamin C memiliki aktivitas yang sangat kuat, hal ini dikarenakan vitamin C merupakan jenis antioksidan murni sehingga memiliki aktivitas yang sangat kuat.

Tabel 8. Hasil Aktivitas Antioksidan fraksi daging buah pala (*Myristica fragrans* Houutt)

Sampel Fraksi	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Sampel	% Inhibisi	Ln IC ₅₀	IC ₅₀
n-Heksan	5		0,647	24,854		
	10		0,538	37,514		
	15	0,861	0,495	42,508	2,875	17,719
	20		0,402	53,100		
	25		0,349	59,465		
Kloroform	5		0,785	8,826		
	10		0,722	16,144		
	15	0,861	0,649	24,622	4,292	73,079
	20		0,616	28,455		
	25		0,561	34,843		
Etil asetat	5		0,487	51,684		
	10		0,416	51,684		
	15	0,861	0,425	51,800	1,742	5,706
	20		0,359	58,304		
	25		0,314	63,530		

Berikut gambar 4 grafik regresi linier aktivitas antioksidan sampel daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) yang di peroleh



Gambar 4. Gravik regresi linier aktivitas antioksidan sampel n-Heksan, Kloroform dan Etil Asetat

Selanjutnya pada hasil uji aktivitas antioksidan yang dilakukan secara kuantitatif dengan menggunakan metode DPPH. Didapatkan hasil pada pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat rata-rata memiliki nilai IC_{50} yang dikategorikan sangat kuat yaitu fraksi etil asetat 5,706 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan fraksi n-heksan 17,719 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Hal ini aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan IC_{50} dikategorikan sangat kuat dikarenakan adanya senyawa yang memiliki kemampuan untuk mendonorkan elektron pada radikal DPPH dalam jumlah besar. Pada fraksi kloroform nilai IC_{50} nya dikatakan kuat yaitu 73,079 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dikatakan kuat dikarenakan menurut Hidayati (2020) nilai IC_{50} kisaran 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dikategorikan kuat [16].

4. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa fraksi ekstrak etanol daging buah pala (*Myristica fragrans* Houtt) memiliki aktivitas

antioksidan yang dikategorikan sangat kuat pada fraksi n-heksan dan etil asetat sedangkan pada fraksi kloroform dikategorikan kuat dan memiliki kadar total senyawa flavanoid yang sangat tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kadar flavanoid maka semakin kuat aktivitas antioksidan.

Referensi

- [1] Satria R, Hakim AR, Darsono PV. Penetapan Kadar Flavonoid Total Dari Fraksi n-Heksana Ekstrak Daun Gelinggang dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Journal of Engineering, Technology, and Applied Science* 2022;4:33-46.
- [2] Rumagit TA, Antasionasti I. Analisis Korelasi Aktivitas Antioksidan Minuman Herbal Pala dengan Kandungan Total Fenolik dan Total Flavonoid 2023;2:58-65.
- [3] Lilyawati SA, Fitriani N, Prasetya F. Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences* 2019:135-8.
- [4] Aminah A, Tomayahu N, Abidin Z. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill) dengan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia* 2017;4:226-30.
- [5] Ritna A, Anam S, Khumaidi A. Identifikasi Senyawa Flavonoid Pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia* Sp .) Asal Kabupaten Morowali Utara. *Galenika Journal of Pharmacy* 2016;2:83-9.
- [6] Taupik M, Mu'thi A, Suryadi A, Bahri Badjeber S, Uno WZ, Moo DR, et al. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Daun *Spigelia anthelmia* L. dan Uji Aktifitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazy). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research (JSSCR)* 2022;4:694-708.
- [7] Lindawati NY, Hudzaifah Ma'ruf S, Tinggi S, Kesehatan I, Surakarta N. Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus Vulgaris* L.) Dengan Metode Kompleks Kolorimetri Secara Spektrofotometri Visibel 2020;6:83-91.
- [8] Puspitasari AD, Wulandari RL. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience* 2017;4. <https://doi.org/10.20527/jps.v4i2.5770>.
- [9] Lindawati NY, Hudzaifah Ma'ruf S, Tinggi S, Kesehatan I, Surakarta N. Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus Vulgaris* L.) Dengan Metode Kompleks Kolorimetri Secara Spektrofotometri Visibel 2020;6:83-91.
- [10] Puspitasari AD, Wulandari RL. Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etil Asetat Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Pharmascience* 2017;4.
- [11] Razoki, Butar-Butar RGS, Neswita E, Sembiring NB, Novriani E, Simanjuntak NJP, et al. Uji skrining fitokimia dan pengukuran kadar total flavonoid pada ekstrak paku (*Nephrolepis biserrata*) dengan fraksi n-heksana, etil asetat, dan air. *Journal of Pharmaceutical and Sciences* 2023;6:1142-60.
- [12] Susiloningrum D, Mugita Sari DE. Uji Aktivitas Antioksidan Dan Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Temu Mangga (*Curcuma Mangga* Valetton & Zijp) Dengan Variasi Konsentrasi Pelarut. *Cendekia Journal of Pharmacy* 2021;5:117-27. <https://doi.org/10.31596/cjp.v5i2.148>.

- [13] Sa'adah H, Nurhasnawati H. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbi bawang tiwai (*Eleutherine americana* Merr) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung* 2015;1:149-53.
- [14] Teuku Hadi Wibowo Atmaja, mudatsir S. ON THE INHIBITION OF *Staphylococcus aureus*. *EduBio Tropika* 2017;5:1-8.
- [15] Dewatisari WF. Perbandingan pelarut kloroform dan etanol terhadap rendemen ekstrak daun lidah mertua (*Sansevieria trifasciata*. Prain) menggunakan metode maserasi. *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, vol. 6, 2020, p. 127-32.
- [16] Hidayati I, Andiarna F, Agustina E. Uji aktivitas antioksidan ekstrak bawang hitam (black garlic) dengan variasi lama pemanasan. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi* 2020;13:39-50.