

Penetapan Kadar Flavonoid Total dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Makadamia (*Macadamia integrifolia*) dengan Metode DPPH

Novika Purwati¹ dan Eka Fitri Yanti^{1*}

¹Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Harapan Bangsa Jember, Indonesia

*Corresponding Author. E-mail: rofi3k4@gmail.com

ABSTRAK

Tanaman makadamia termasuk famili Protaceae yang berasal dari Australia. Tanaman kacang makadamia memiliki sifat sebagai antioksidan yang dihasilkan oleh tocopherols, tocotrienols dan squalen. Senyawa fitokimia genus makadamia memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, antidislipidemia dan antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun makadamia dan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH. Sampel daun makadamia dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Analisis kadar flavonoid total dilakukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis dan dinyatakan dalam *Quercetin Equivalent* (QE). Uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH dengan menghitung nilai IC₅₀. Hasil analisis menunjukkan bahwa kadar flavonoid total ekstrak etanol 25,39 ± 0,22 mg QE/g ekstrak, sedangkan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia (*Macadamia integrifolia*) memiliki nilai IC₅₀ 24,99 µg/mL dan termasuk intensitas sangat kuat.

Kata Kunci: Daun makadamia, kadar flavonoid total, antioksidan

ABSTRACT

*Macadamia plants belong to the Proteaceae family originating from Australia. Macadamia nuts have antioxidant properties produced by tocopherols, tocotrienols, and squalene. Phytochemical compounds of the macadamia genus have antioxidant, anti-inflammatory, antidislipidemi, and antimicrobial activities. This study aimed to determine the total flavonoid content of the ethanol extract macadamia leaf and to test the antioxidant activity using the DPPH method. Macadamia leaf samples were macerated using 96% ethanol of solvent. Analysis of total flavonoid content was carried out using UV-Vis spectrophotometer method. Content was expressed in Quercetin Equivalent (QE). The antioxidant activity was tested the DPPH method by calculating the IC₅₀ value. The analysis showed that a total flavonoid content of the ethanol extract was 25.39 ± 0.22 mg QE/g extract, while the antioxidant of the ethanol extract macadamia leaf (*Macadamia Integrifolia*) activity of the IC₅₀ was 24.99 µg/mL and included moderate very strong intensity.*

Keywords: *Macadamia leaf, total flavonoid content, antioxidants.*

Submitted: September 25th 2022 | Accepted: December 14th 2022 | Published: December 31st 2022

Pendahuluan

Tanaman makadamia yang mempunyai nama Queensland (Australia) termasuk famili Proteaceae merupakan pohon asli dari daerah sub tropis Australia. Untuk jenis yang bisa dimakan adalah bijinya yang dikenal dengan nama *Macadamia integrifolia* dengan permukaan tempurung atau batok halus. Tinggi tanaman makadamia bisa sampai mencapai 18 meter. Di Indonesia tanaman makadamia tumbuh di Cibodas, Lembang, dan Blawan (Kawasan Pegunungan Ijen) yang memiliki ketinggian ± 1.000 mdpl dengan suhu ≤ 32°C. Tanaman makadamia dapat tumbuh dengan baik dan berbuah banyak. Tetapi tanaman makadamia yang ditanam di dataran rendah ± 50 mdpl dengan suhu yang tinggi dan ditanam dimusim kemarau yang panjang seperti di pasuruan (Jawa Timur) maka tanaman makadamia tidak dapat berbuah [1]

Maguire et al., (2004) menyebutkan kacang makadamia

kaya akan unsur-unsur penting bagi kesehatan seperti kalsium, besi, fosfor, magnesium dan vitamin seperti tiamin (B1), riboflavin (B2), retinol (A1) dan niasin (B3) [2]. Selain karakteristik nutrisi kacang makadamia juga memiliki sifat sebagai antioksidan yang dihasilkan oleh tocopherols, tocotrienols dan squalen. Sedangkan yang biasa digunakan adalah minyak makadamia karena mengandung Vitamin E yang merupakan antioksidan alami. Antioksidan alami berasal dari setiap bagian tumbuhan seperti kulit, buah, biji, kayu, batang, bunga, akar, dan daun [3].

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia (*Macadamia integrifolia*) dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil).

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menghalangi proses reaksi oksidasi melalui pengikatan dengan molekul dan radikal bebas yang sangat reaktif (Winarsi, 2007). Salah satu

sumber antioksidan alami berasal dari tumbuhan. Tumbuhan yang mengandung senyawa dan memiliki aktivitas sebagai antioksidan adalah flavonoid. Flavonoid adalah golongan polifenol terbesar dan sangat efektif digunakan sebagai antioksidan. Sifat antioksidan sebagai penangkap radikal bebas karena mengandung gugus hidroksil. Hubungan antara flavonoid dan antioksidan diketahui melalui pernyataan bahwa semakin tinggi kandungan flavonoid total suatu bahan maka aktivitas antioksidan semakin tinggi [4]. Penentuan kadar flavonoid total dilakukan dengan menggunakan larutan kuersetin. Kuersetin termasuk dalam senyawa yang berpotensi paling tinggi dalam golongan fenolik [5].

Selain itu kuersetin merupakan golongan flavonoid yang membentuk senyawa kompleks dengan adanya $AlCl_3$ [6]. Pada penelitian ini yang digunakan adalah daun makadamia tua. Semakin tua daun maka hijau warna daun akan semakin tinggi kandungan klorofilnya. Proses fotosintesis pada tumbuhan hijau menyusun senyawa organik dari karbondioksida dan air. Pada daun tua laju fotosintesisnya lebih cepat dari pada daun muda. Dan untuk mengetahui kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol daun makadamia dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis sedangkan pada pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode DPPH (*1,1 difenil-2-pikrilhidrazil*). Metode DPPH juga merupakan metode yang sensitiv untuk menguji sebuah aktivitas antioksidan (Yuniwati et al., 2018). Metode DPPH merupakan metode yang sering dipilih karena sederhana, mudah, peka dan hanya memerlukan sedikit sampel.

Bahan dan Metode

Alat

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah batang pengaduk (Pyrex), blender (Miyako), Oven (Meymert), Erlenmeyer (Pyrex), cawan porselin, beker gelas (Pyrex), kuvet (Pyrex), vial (Sanbe), pipet tetes (Pyrex), penjepit tabung, rak tabung reaksi, kertas saring, kertas perkamen, timbangan analitik (Sartorius), rotary evaporator (Steroglass 300), corong (Herma), labu ukur (Pyrex), Aluminium Foil, seperangkat alat maserasi, pengayak 60 mesh (ASTME), mikropipet (Socorex), vortex (Thermo Scientific), ultrasonic (Elma), pit dan spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1280).

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun makadamia tua yang berwarna hijau berasal dari PT Perkebunan Nusantara XII desa Blawan, etanol 96% (OneMed), metanol (OneMed), Kuersetin (sigma), $AlCl_3$ (Merck), aquadest, Natrium asetat (Merck), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) (PT. Smartlab Indonesia)

Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Jember.

1. Pengambilan Sampel: Daun makadamia yang diperoleh dari PT Perkebunan Nusantara XII desa Blawan dengan karakteristik daun yang berwarna hijau tua. Kemudian daun disortir dan dikeringkan dipanas matahari dengan ditutupi kain berwarna hitam, di oven dengan suhu rendah (500) sampai beratnya stabil, diblender dan diayak menggunakan ukuran 60 mesh. Serbuk simplisia di

remaserasi dan maserasi.

2. Pembuatan ekstrak sampel dengan metode maserasi : 200 gram serbuk simplisia dimasukkan kedalam bejana toples kaca ditambahkan dengan 1000 mL etanol 96% lalu ditutup dan diremaserasi. Maserat diekstraksi kembali dengan etanol 96%. Hal ini dilakukan sebanyak 2 kali 24 jam selama 3 hari terlindung dari cahaya matahari. Ekstrak etanol yang diperoleh kemudian di pekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 500C hingga dihasilkan ekstrak kental.
3. Penetapan Kadar Flavonoid Total dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis
 - a. Larutan Induk Standar Kuersetin : 10mg kuersetin dilarutkan dengan 10 mL etanol sebagian larutan standar kuersetin 1000 $\mu\text{g/mL}$ dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 60 $\mu\text{g/mL}$, 70 $\mu\text{g/mL}$. sebanyak 0,5mL larutan standar kuersetin ditambahkan dengan 0,5 mL etanol 96%, ditambahkan 0,1 mL $AlCl_3$, ditambahkan 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadest dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya ukur absorbansi panjang gelombang 400 nm – 800 nm.
 - b. Penentuan Serapan Larutan Blanko: Larutan Kuarsetin sebanyak 1 mL dengan pelarut etanol 96% sampai volume 5 mL labu ukur. Di vortex dan dibiarkan selama 60 menit. Ukur absorbansi panjang gelombang 400 nm – 800 nm.
 - c. Penentuan Kadar Flavonoid Pada Ekstrak Etanol Daun Makadamia: 20 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL etanol sehingga diperoleh konsentrasi 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sebanyak 0,5 mL sampel uji ditambah 1,5 mL etanol 96% ditambah 0,1 mL $AlCl_3$, ditambah 0,1 mL natrium asetat 1 M dan 2,8 mL aquadest. Kemudian kocok sampai homogen. Pembuatan ekstrak uji dilakukan 3 kali replikasi. Larutan dibiarkan selama 30 menit. Selanjutnya ukur absorbansi panjang gelombang 400 nm – 800 nm.
 - d. Kandungan Flavonoid total diperoleh dengan cara memasukkan data absorbansi sampel kedalam persamaan kurva baku kuersetin, absorbansi dimasukkan dalam persamaan kurva baku kuersetin sebagai nilai y, dimana nilai x yang diperoleh merupakan konsentrasi kuersetin dalam $\mu\text{g/mL}$. Kadar kuersetin dalam ekstrak etanol daun makadamia dihitung dengan rumus :

$$C = C_1 \times \frac{V}{m} \times FP$$
4. Penentuan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Makadamia
 - a. Pembuatan Larutan Stok DPPH: 4 mg DPPH dilarutkan dengan 25 mL metanol menghasilkan larutan DPPH 160 $\mu\text{g/mL}$. Disimpan dalam suhu ruang dan terhindar dari cahaya matahari.
 - b. Pembuatan Larutan Sampel : 100 mg sampel masing-masing dilarutkan dengan 10 mL metanol dalam labu ukur 10 mL. Dilakukan pengenceran dalam labu ukur 10 mL dengan menambahkan metanol dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 300 $\mu\text{g/mL}$.
 - c. Penentuan Panjang Gelombang Maksimal : 0,75 mL larutan DPPH ditambahkan 0,25 mL metanol, diukur panjang gelombang scan 400 nm – 800 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis.
 - d. Penentuan Aktivitas Antioksidan : Masing-masing konsentrasi larutan uji sebanyak 0,25 mL dimasukkan

dalam tabung reaksi, ditambahkan 0,75 mL DPPH dan dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian diinkubasi dalam oven selama 30 menit dengan suhu 370C. Diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang dari 400 nm – 800 nm.

- e. Penentuan Persentase Peredaman: Aktivitas penangkapan radikal bebas (persen inhibisi) dihitung sebagai persentase berkurangnya warna DPPH dengan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100 \%$$

- f. Nilai IC50 merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji yang memberikan peredaman sebesar 50%. Nilai IC50 ditentukan dengan cara dibuat kurva linier antara konsentrasi larutan uji (sumbu x) dan % peredaman (sumbu y) dari persamaan $y = a + bx$ dapat di hitung nilai IC50 dengan rumus :

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

Analisa Data

Deskriptif kuantitatif. Data yang diperoleh dari uji flavonoid total dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia dibuat dalam bentuk tabel, diagram, kurva kemudian di deskripsikan. Aktivitas antioksidan dihitung dengan rumus :

$$\text{Inhibisi DPPH} = \frac{\text{Abs blanko} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs blanko}} \times 100 \%$$

Persen inhibisi aktivitas antioksidan dari berbagai konsentrasi ekstrak dan kuarsetin dibuat persamaan regresi linier. Dimana sumbu x adalah konsentrasi sampel dan Sumbu y adalah persen inhibisi aktivitas antioksidan, sehingga $y=ax+b$. Nilai IC50 dihitung ketika persen aktivitas antioksidan sebesar 50% yaitu konsentrasi larutan yang mampu memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (Molyneux, 2004).

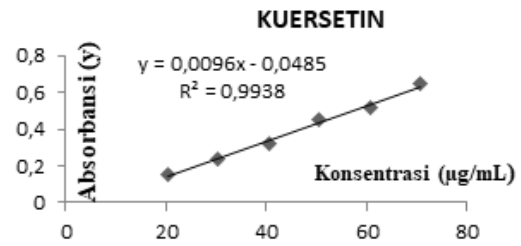
Hasil

Tabel 1. Hasil Ekstrak Etanol Daun Makadamia

Sampel	Simplisia	Ekstrak Kental	Rendemen (%)
Daun Makadamia	200 gram	13,95 gram	6,975 %



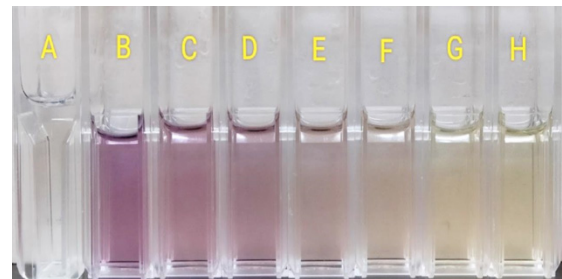
Gambar 1. Uji Flavonoid Dengan Beberapa Konsentrasi
Keterangan : A : Blanko; B, C, D, E, F, G : Standart Quarsetin 20 µg/mL, 30 µg/mL, 40 µg/mL, 50 µg/mL, 60 µg/mL, 70 µg/mL; H, I, J : Sampel



Gambar 2. Grafik Regresi Linier Standart Kuersetin

Tabel 2. Hasil Penetapan Kadar Flavonoid Total

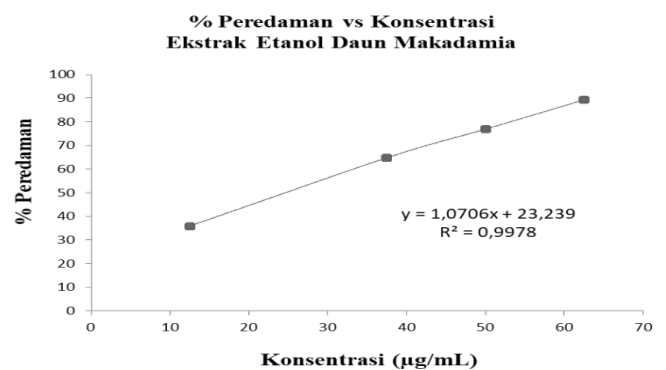
Replikasi	Absorbansi (y)	Kadar flavonoid total (mg QE/g ekstrak)	Rata-rata Kandungan flavonoid total (mg QE/g ekstrak)
1	0,431	26,21	25,39 ± 0,22
2	0,427	25,24	
3	0,426	24,72	



Gambar 3. Warna Sampel ekstrak etanol daun makadamia akibat peredaman DPPH

Tabel 3. Data Konsentrasi dan Absorbansi Ekstrak Etanol Daun Makadamia

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (y)	% Peredaman
12,5	0,456	35,86
37,5	0,250	64,83
50	0,164	76,93
62,5	0,076	89,31



Gambar 4. Grafik % peredaman vs konsentrasi ekstrak etanol etanol daun macadamia

Tabel 4. Data perhitungan IC50 dari ekstrak etanol daun makadamia

Konsentrasi ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Peredaman	Persamaan Garis Linier	IC ₅₀ $\mu\text{g}/\text{mL}$
12,5	35,86		
37,5	64,83	$y = 1,0706x + 23,239$	24,99
50	76,93	$R^2 = 0,9978$	
62,5	89,31		

Pembahasan

Serbuk kering daun makadamia (*Macadamia integrifolia*) yang telah di remaserasi dan maserasi kemudian di oven sampai beratnya stabil, sehingga dihasilkan ekstrak kental sebesar 13,95gram dengan rendemen 6,975%. Penentuan rendemen ini berfungsi untuk mengetahui kadar metabolit sekunder yang terbawa oleh pelarut namun tidak dapat menentukan jenis senyawa yang terbawa oleh pelarut [7]. Dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Untuk penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun makadamia menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Panjang gelombang maksimum kuarsetin yang didapatkan yaitu 439 nm. Larutan standar kuarsetin dengan konsentrasi 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, dan 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Dari data pengukuran standar kuarsetin dan data absorbansi menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi maka semakin tinggi pula absorbansi yang diperoleh. Dapat dilihat dalam Tabel 2. Nilai absorbansi bergantung pada kadar zat yang terkandung didalamnya sehingga semakin banyak kadar zat yang terkandung dalam suatu sampel maka semakin banyak molekul yang akan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu. Dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Berdasarkan kurva standar didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0096x - 0,0485$ dengan nilai kolerasi (r) sebesar 0,9938. Hasil kadar flavonoid total ekstrak etanol daun makadamia yaitu $25,39 \pm 0,22$ mg QE/g Ekstrak. Dapat dilihat pada **Gambar 2** dan **Tabel 2**.

Panjang gelombang maksimum DPPH yang di dapatkan yaitu 516 nm. Penentuan aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia dengan konsentrasi 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. ketika penelitian ini berlangsung sampel yang digunakan mengakibatkan terjadinya perubahan warna pada larutan DPPH dari ungu pekat menjadi kuning pucat, bisa dilihat pada **Gambar 3**.

Hal tersebut menunjukkan bahwa pada ekstrak etanol daun makadamia memiliki aktivitas sebagai antioksidan. Selanjutnya pengukuran absorbansi ekstrak etanol daun makadamia pada setiap konsentrasi untuk menghasilkan persen peredaman. Hasil konsentrasi dan absorbansi ekstrak etanol daun makadamia dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Berdasarkan dari data terdapat penurunan absorbansi DPPH pada larutan uji dapat dihitung peredaman DPPH (%). Setelah diperoleh hubungan antara konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPPH, sehingga didapatkan persamaan regresi yaitu $y = 1,0706x + 23,239$ dengan koefisien kolerasi sebesar 0,9978. Hasil regresi linier ini menunjukkan adanya kolerasi yang baik antara konsentrasi larutan uji dan persen

peredaman DPPH. Dapat dilihat pada **Gambar 4**.

Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia, digunakan nilai IC50 sebagai parameter karena IC50 menunjukkan nilai konsentrasi yang mampu meredam 50% radikal bebas DPPH. Nilai diperoleh dari mensubstitusi nilai Y dari persamaan regresi linier antara konsentrasi larutan uji dan persen peredaman DPH dengan nilai 50. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC50 yaitu konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk menghambat 50% radikal bebas DPPH.

Nilai IC50 yang diperoleh dari ekstrak etanol daun makadamia adalah 24,99 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Menurut (Lung & Destiani, 2017) [8] kategori kekuatan senyawa antioksidan yaitu <50 sangat kuat, 50 - 100 kuat, 100 - 250 sedang, 250 - 500 lemah dan >500 tidak aktif. Sehingga dari hasil di atas dapat digolongkan sebagai aktivitas antioksidan sangat kuat karena hasil kurang dari 50. Dapat dilihat pada **tabel 4**. Semakin kecil nilai IC50 maka semakin tinggi aktivitas antioksidan.

Kesimpulan

Hasil kadar flavonoid total ekstrak etanol daun makadamia (*Macadamia integrifolia*) sebesar $25,39 \pm 0,22$ mg QE/g Ekstrak. Aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun makadamia (*Macadamia integrifolia*) memiliki nilai IC50 sebesar 24,99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ termasuk dalam kategori golongan antioksidan sangat kuat.

Referensi

- [1] Puspitojati, T., Siarudin, M., & Widiyanto, A. 2017. Mengenal Hasil Hutan Bukan Kayu: 18 Jenis Tanaman Penghasil Minyak Lemak. Bogor: Forda Press. Halaman 41-43.
- [2] Maguire, L. S., S.M. O'sullivan, K. Galvin, T.P. O'connor, dan N.M. O'brien. 2004. *Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the Macadamia nut*. *International journal of food sciences and nutrition*. 55(3) : 171-178.
- [3] Pratt, D.E. 1992. *Natural Antioxidants From Plant Material*. Didalam : M.T. Huang, C.T. Ho, Dan C.Y. Lee, Editor. *Phenolic Compounds In Food And Their Effects On Helath* H. American Society, Washington DC.
- [4] Erukainure OL., Oe OV., Ajiboye AJ., Okafor OY. 2011. *Nutritional qualities and phytochemical constituents of clerodendrumvolubile, a tropical nonconventional vegetable*. *International Food Research Journal*. 18 (4): 1393-1399.
- [5] Prior, R.I. 2003. *Fruit And Vegetables In The Prevention Of Cellular Oxidative Damage*. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (1Prior, R.I. 2003. *Fruit And Vegetables In The Prevention Of Cellular Oxidative Damage*. *Am. J. Clin. Nutr.* 78 (1Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. *Anticancer Potential of Plants and Natural Products: A Review*. *Am J Pharmacol Sci*. 2013;1(6):104-15. doi:10.12691/ajps-1-6-1
- [6] Kelly, S.G. 2011. *Quercetin*. *Alternative Medicine Review*. 16 (2).
- [7] Markham, 1988, Cara Identifikasi Flavonoid. Hal 1-20, Penerbit ITB, Bandung.
- [8] Lung, J. K. S., & Destiani, D. P. 2017. Uji Aktivitas Antioksidan Vitamin A, C, E dengan Metode DPPH. *Farmaka Suplemen*. 15(1): 53-56.