

PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DARI EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI KULIT BATANG WARU (*Hibiscus tiliaceus* L.) DENGAN METODE ABTS

Determination of Flavonoid Levels Total and Test Antioxidant Activity from Ethanol Extracts and Fractions Waru Skin (Hibiscus tiliaceus L.) with ABTS Method

Ade Erma Novita Sari^{1*)}

¹⁾Universitas Duta Bangsa, Jalan Pinang Nomor 47, Jati, Cemani, Jawa Tengah Indonesia
*e-mail: adeermanovitasari25@gmail.com

ABSTRAK

Antioksidan adalah senyawa yang dapat menetralkan, menurunkan dan menjadi penghambat terbentuknya radikal bebas baru ditubuh menjadi pendonor elektron dari radikal bebas sehingga berpasangan serta menghentikan kerusakan pada tubuh. Kulit batang waru atau *Hibiscus tiliaceus* L. adalah tanaman yang berpotensi menjadi sumber utama antioksidan yang terbentuk alami. Kulit batang waru diketahui memiliki aktivitas antioksidan di fraksi n-heksan, fraksi etil asetat serta fraksi air. Tujuan dalam penelitian yaitu mengetahui aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol dan fraksi kulit batang waru memakai metode ABTS (2,2 Azinobis (3 ethylbenothiazoline) 6-Sulfonic Acid). Kulit batang waru di ekstraksi memakai metode maserasi memakai etanol 96% dapat dilanjutkan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat serta air. Kadar flavonoid ditentukan menggunakan spektrofotometri UV-VIS di panjang gelombang 435 nm. Uji aktivitas antioksidan memakai metode ABTS di panjang gelombang 730 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar flavonoid ekstrak etanol kulit batang waru adalah 11.973 ± 0.055 QE. Hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat serta fraksi air dengan nilai IC₅₀ berturut-turut ialah 71.78 ppm, 105.45 ppm, 40.90 ppm, dan 64.23 ppm aktivitas antioksidan tertinggi ditunjukkan oleh fraksi etil asetat dengan nilai IC₅₀ 40.90 ppm dengan aktivitas sangat kuat.

Kata kunci: ABTS, antioksidan, flavonoid, fraksi, kulit batang waru

ABSTRACT

*Antioxidants consists of compounds that neutralize, reduce and inhibit the formation of new free radicals in the body by becoming free radical electron donors so that they become paired and stop damage to the body. The bark of waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) has the potential to be a source of natural antioxidants. Waru bark is known to have antioxidant activity in several fractions. This research was to determine the antioxidant activity test of ethanol extract and hibiscus bark fraction using the ABTS method (2,2 Azinobis (3 ethylbenothiazoline) 6-Sulfonic Acid). The hibiscus bark was extracted using maceration method using 96% ethanol followed by fractionation using solvent n-Hexane, ethyl acetate and water. Flavonoid levels were determined using UV-VIS spectrophotometry at a wavelength of 435 nm. The antioxidant*

activity test used the ABTS method at a wavelength of 730 nm. The results showed that the flavonoid content of the ethanol extract of waru stem bark was $11.973 \pm 0.055QE$. The results of the antioxidant activity test of ethanol extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction and water fraction with IC_{50} values were 71.78 ppm, 105.45 ppm, 40.90 ppm, and 64.23 ppm. The highest antioxidant activity is indicated by the ethyl acetate fraction with IC_{50} value of 40.90 ppm with very strong activity.

Keywords: ABTS, antioxidants, flavonoids, fractions, waru bark

PENDAHULUAN

Kemajuan IPTEK merubah gaya hidup masyarakat di era terkini. Perubahan tersebut antara lain terkait dengan nutrisi, kebiasaan makan yang buruk, olahraga yang tidak seimbang dan istirahat. Selain itu, kualitas lingkungan yang buruk akan menurunkan kualitas hidup masyarakat dan mengurangi pembentukan zat yang melindungi tubuh kita.

Radikal bebas yaitu molekul-molekul labil dan reaktif satu atau lebih elektron tidak berpasangan diorbit luar yang memiliki kemampuan untuk merusak biomolekul integritas lipid, protein, dan DNA serta meningkatkan stres oksidatif (Soeksmanto dkk, 2007). Senyawa antioksidan diperlukan menetralkan, mengurangi, dan menghambat terbentuknya radikal bebas yang baru di dalam tubuh sebagai pendonor elektron bagi radikal bebas sehingga elektron bebas pada radikal bebas akan berpasangan dan menghentikan kerusakan ditubuh guna mencegah penumpukan radikal bebas yang dapat mengakibatkan perkembangan penyakit degeneratif (Rao & Møller, 2011). Senyawa antioksidan ada di tanaman baik di daun, bunga, batang, serta akar. tanaman yang memiliki senyawa bioaktif yaitu flavonoid, alkaloid serta terpenoid memiliki potensi antioksidan yang alami.

Tanaman waru ialah jenis tanaman yang relatif berpotensi mempunyai kandungan senyawa antioksidan yang merupakan suku kapas-kapasan atau Malvaceae. Kandungan fitokimia tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) yang dilaporkan ialah protein, karbohidrat, fenol, tanin, flavonoid, saponin, glikosida, steroid, terpenoid, serta konstituen kimia alkaloid (Andriani et al., 2017). Menurut Kumar et al (2008) kulit batang tanaman waru memiliki kandungan bahan kimia *Hibiscusamide*, *N-trans feruloyltiramine*, dan *N-cis feruloyltiramine* serta memiliki sifat toksik bagi sel-sel kanker. Akar kulit batang waru juga mengandung tanin, saponin, dan flavonoid.

METODE

Alat dan Bahan

Peralatan yang dipergunakan yaitu alat maserasi, timbangan analitik (Fujitsu), rotary evaporator (RE-100 PRO), waterbath (Faithful), oven (Binder), spektrofotometri UV-VIS (genesys 10 s).

Bahan yang dipergunakan yaitu kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), standar kuersetin, metanol p.a, etanol 96%, serbuk magnesium, $AlCl_3$ p.a, akuades, $C_4H_8O_2$ (etil asetat), C_6H_{14} (n-heksan), serbuk ABTS, 2,2'azinobis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid), $K_2S_2O_8$ (kalium persulfat), $C_2H_3NaO_2$ (natrium asetat), NaCl (natrium klorida), KCl (kalium klorida), Na_2HPO_4 (natrium idrogen fosfat), $CaHPO_4$ (kalium hidrogen fosfat).

Ekstrak Kulit Batang Waru.

Kulit batang waru berasal Kecamatan Jogonalan, Kabupaten Klaten, Jawa Tengah. Kulit batang waru selanjutnya dibuat menjadi simplisia dengan cara pengeringan menggunakan metode diangin-anginkan selanjutnya diserbukkan hingga menjadi serbuk simplisia. Sebanyak

500 g serbuk kulit batang waru dimaserasi menggunakan 5000 mL pelarut etanol 96%. Hasil penyaringan diuapkan menggunakan mesin *vacum rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental kulit batang waru. Selanjutnya melakukan ekstraksi cair-cair memakai tiga jenis pelarut yg berbeda yaitu C_6H_{14} (*n*-heksan), $C_4H_8O_2$ (etil asetat) serta akuades.

Fraaksinasi Kulit Batang Waru.

Sebanyak 10 g ekstrak kental kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus L*) lalu dilarutkan menggunakan 150 mL akuades dimasukan ke alat corong pisah dengan 150 mL *n*-heksan kemudian dibiarkan memisah terbentuk dua lapisan (akuades di bawah dan lapisan *n*-heksan di atas) kemudian ambil lapisan *n*-heksan selanjutnya dilarutkan 150 mL etil asetat digojog dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan (akuades di bawah serta lapisan etil asetat di atas). Pemisahan dilakukan sebanyak tiga kali hingga fase *n*-heksan jernih, seluruh fasa kemudian dipekatkan dengan mesin *rotary evaporator* untuk menghasilkan fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air (Vifta & Advistasari, 2018).

Pengukuran Parameter

Parameter Non Spesifik

1) Penetapan Susut Pengerinan

Dua gram serbuk dan ekstrak dimasukkan pada kurs porselin tertutup dan sebelumnya telah dipanaskan dalam waktu 30 menit serta pada suhu $105^{\circ}C$ dan harus sudah ditara. Serbuk dan ekstrak diratakan pada kurs dengan cara menggoyangkan kurs sampai terbentuknya lapisan tebal 5 - 10 mm, kemudian ditimbang. Tahap selanjutnya masukkan kedalam oven lalu dibuka tutupnya dan tunggu hingga beratnya stabil. Tentukan persentase setelah didinginkan dalam desikator (Depkes RI, 2000).

2) Kadar Air

Sebanyak 2 gram serbuk dan ekstrak dimasukan kedalam oven selama > 5 jam suhu stabil $105^{\circ}C$. Setelah dingin dalam desikator ≥ 15 menit, ditimbang hingga bobot tetap (Depkes RI, 2000).

3) Kadar Abu Total

Sebanyak 2 gram serbuk dan ekstrak dimasukkan pada krus porselin yang sudah ditara yang kemudian melakukan penguapan di atas penangas air hingga kering. Pembakaran arang di lakukan dengan tanur listrik selama kurang lebih 3 jam pada suhu maksimum $550^{\circ}C$ sambil sedikit membuka pintu tungku agar oksigen masuk di suhu maksimum. Dinginkan pada deksikator, kemudian timbang menggunakan bobot tetap (Depkes RI, 2000).

Uji Kandungan Kimia

1) Uji Flavonoid

Serbuk HCl dan Mg pekat diteteskan ke dalam tabung reaksi yang berisi 1 g ekstrak. Bila mengandung flavonoid jika timbul warna merah atau kuning (Muthmainnah B, 2017).

2) Uji Alkaloid

Lima mL HCl 2 N dari ekstrak 2 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi, dan dibagi menjadi 3 tabung reaksi masing-masing 1 mL. Setiap tabung ditambahkan menggunakan masing-masing reagen. Jika menghasilkan endapan putih atau kuning setelah dicampur dengan pereaksi Mayer positif alkaloid. Selain pereaksi Wagner jika terbentuk endapan coklat positif mengandung alkaloid. Dan penambahan reagen Dragendrof jika terbentuk endapan jingga positif alkaloid (Muthmainnah, 2017).

3) Uji Terpenoid Steroid

Pereaksi Lieberman-Burchard ditambahkan e dalam 1 gram ekstrak yang telah dilarutkan dalam etanol. Munculnya warna biru atau ungu menunjukkan hasil positif untuk senyawa steroid, sedangkan warna merah kecoklatan menunjukkan hasil yang untuk senyawa triterpenoid (Muthmainnah, 2017).

4) Uji Saponin

Satu gram ekstrak yang diuji dicampur dengan 10 mL air panas dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Saponin positif jika busa setinggi 1 sampai 10 cm dan bertahan minimal 10 menit (Muthmainnah B, 2017).

5) Uji Tanin

Satu gram ekstrak dimasukkan kedalam tabung berisi 10mL air mendidih, dipanaskan 5 menit, kemudian ditambahkan 3 - 4 tetes FeCl_3 ke dalam filtrat. Jika berwarna biru kehijauan menunjukkan adanya gugus tanin katekol, sedangkan jika berwarna biru dan hitam menunjukkan adanya gugus tanin pirogarol (Muthmainnah B, 2017).

6) Pengujian dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) secara berulang kali dengan berbagai eluen dengan berbagai tingkat polaritas. Menggunakan lampu di UV 254nm dan UV 365nm digunakan untuk memantau bercak pada pelat KLT. Penentuan pada golongan senyawa uji KLT menggunakan penyemprotan dengan memakai pereaksi Sitoborat, Dragendorff, FeCl_3 , serta Lieberman-Burchard.

Analisis Kuantitatif

A) Pembuatan Kuersetin

1) Pembuatan Larutan Standart Kuersetin

Dibuat deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm serta 25 ppm dengan diambil sebanyak 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL dan 1,25 mL dengan menimbang 10 mg bubuk kuersetin yang dilarutkan menggunakan metanol p.a ke dalam labu ukur 100 mL sehingga dihasilkan konsentrasi 100 ppm.

2) Penentuan Panjang Gelombang

Suatu larutan kuersetin 20 ppm diambil 1 mL ditambah 1 mL larutan AlCl_3 dan 1 mL larutan $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ yang digunakan untuk mengukur panjang gelombang maksimum, menghitung panjang gelombang maksimum antara 400- 450 nm (Aminah *et al*, 2017)

3) Penentuan *Operating Time*

Satu mL larutan kuersetin 20 ppm ditambah 1 mL larutan AlCl_3 10% serta 1 mL larutan $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ diukur serapannya di panjang gelombang maksimum dengan setiap dua menit sampai diperoleh absorbansi stabil (Indrayani, 2008).

4) Pembuatan Kurva Baku

Ambil 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, 1 mL, dan 1,25 mL larutan baku kuersetin diencerkan hingga 5 mL pada masing-masing konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Masing-masing konsentrasi larutan diambil 1 mL ditambahkan 1mL AlCl_3 dan 1 mL larutan $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ Sampel diinkubasi selama waktu operating time yang diperoleh dan absorbansi ditentukan memakai teknik spektrofotometri UV-VIS di panjang gelombang maksimum (Kusuma, 2012).

5) Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak.

Timbang 10 mg ekstrak kulit batang waru dilarutkan dalam 10 mL p.a. Larutan diambil 1 mL ditambahkan 1 mL AlCl_3 10% serta 1 mL larutan $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$. Sampel diinkubasi selama waktu operating time di suhu kamar. Kandungan flavonoid ditentukan dengan persamaan regenerasi linier dan pembacaan dari kurva kalibrasi spektrofotometer UV-VIS, dengan rumus $y = a + bx$. Data absorbansi hasil pengukuran ini terapkan kedalam persamaan regresi linier dimana y menjadi konsentrasi larutan standar.

B) Pengujian Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS.

1) Pembuatan Larutan Baku Pembanding Kuersetin

Membuat kuersetin konsentrasi 100 ppm dengan menimbang sebanyak 10 mg bubuk kuersetin dilarutkan dengan menggunakan metanol p.a dengan labu ukur 100 mL. Larutan baku 100 ppm dipipet masing-masing pada 0,25 mL, 0,5 mL, 0,75 mL, dan 1 mL, 1,25 mL pada konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm. Tambahkan metanol p.a perlahan-lahan sampai garis batas setelah ditambahkan ke dalam labu ukur 5 mL (Kusuma, 2012).

2) Pembuatan Larutan Blanko ABTS.

- a. Larutan ABTS: Masukkan 18 mg ABTS (7 mM) ke dalam labu ukur 5 mL setelah dilarutkan dengan akuades.
- b. Larutan $K_2S_2O_8$: Ditimbang Kalium persulfat (2,45 mM) sebesar 14 mg yang dilarutkan dengan akuades sampai tanda batas 250 mL (Pulungan, 2018).
- c. Larutan PBS: Ditimbang sebesar 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 14 g Na_2HPO_4 serta 0,24 $CaHPO_4$ dilarutkan dengan akuades sampai 1 L.
- d. Larutan stok ABTS: Sebanyak 5 mL larutan ABTS ditambahkan 5 mL larutan $K_2S_2O_8$ diinkubasi di ruang gelap suhu kamar 22-24°C selama 12-16 jam sebelum digunakan serta menghasilkan ABTS dengan warna biru gelap.

3) Penentuan Panjang Gelombang.

Ambil 1 mL larutan stok ABTS, kemudian campurkan dengan 25 mL PBS. Absorbansi larutan diukur antara 700 dan 750 nm dan panjang gelombang di mana larutan menunjukkan penyerapan terbesar diidentifikasi (Pulungan, 2018).

4) Penentuan *Operating Time*

Larutan standar kuersetin 15 ppm diambil 0,1 mL ditambahkan 2 mL larutan stok ABTS. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang maksimum dengan waktu 1 menit sampai diperoleh absorbansi yang stabil (Rosidah et al, 2008).

5) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Dengan Baku Perbandingan

Larutan standar kuersetin dibuat konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, dan 25 ppm masing - masing konsentrasi diambil sebesar 1 mL ditambah 2 mL larutan stok ABTS, larutan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan menggunakan metode spektrofotometri UV-VIS di panjang gelombang maksimum (Faisal, 2019).

6) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Kontrol

Larutan ABTS diambil 1 mL dan ditambahkan 2 mL PBS, diinkubasi selama *operating time*, baca di panjang gelombang maksimum.

7) Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel (Ekstrak Etanol, Fraksi n-Heksan, etil asetat dan air)

Larutan stok sampel 1000 ppm dibuat dengan menimbang (Ekstrak Etanol, Fraksi Air, Fraksi n-Heksan dan Fraksi Etil Asetat Kulit batang Waru) 10 mg, dilarutkan menggunakan metanol p.a hingga 10 mL. dibuat larutan ekstrak menggunakan deret konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, serta 50 ppm dibuat dari larutan ekstrak 100 ppm yang dipipet masing-masing sebesar 0,5 mL, 1 mL, 1,5 mL, 2 mL serta 2,5 mL kemudian ditambahkan metanol p.a sampai 5 mL. Setiap konsentrasi dipipet sebesar 0,1 mL larutan ekstrak ditambah 2 mL larutan stok ABTS, larutan diinkubasi selama waktu *operating time* yang diperoleh dan diukur serapan menggunakan spektrofotometri UV-VIS di panjang gelombang maksimum dilakukan replikasi 3 kali (Faisal, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi

Sampel kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L) sebanyak 500 gram yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 5000 mL menghasilkan

berat ekstrak yaitu 20,968 gram dengan persen rendemen sebanyak 4,19%. Hasil ekstrak kulit batang waru terlampir pada tabel 1.

Tabel 1 Ekstraksi Kulit batang Waru

Serbuk Simplisia	Ekstrak Kental	Persentase Rendemen
500g	20,968 g	4.19%

Fraksi Kulit Batang Waru

Fraksi air dari ekstrak kulit batang sebanyak 2 g dengan rendemen 20%. Fraksi *n*-heksan kulit batang waru sebanyak 1.15 g dengan rendemen 11.5 % sedangkan fraksi etil asetat sebanyak 2.25 g dengan rendemen 22.5 %. Dari ketiga fraksi, fraksi etil asetat adalah fraksi dengan rendemen tertinggi.

Tabel 2 Fraksinasi Kulit Batang Waru

Bobot Ekstrak (gr)	Fraksi	Bobot Fraksi (gr)	Rendemen (%)
10	Fraksi Air	2.00	20
	Fraksi <i>n</i> -Heksan	1.15	11.5
	fraksi etil asetat	2.25	22.5

Pengukuran Parameter

a. Susut Pengeringan.

Parameter non spesifik ini bertujuan membuat batasan yang maksimal terhadap besar senyawa yang akan hilang diproses pengeringan. Parameter ini intinya ialah mengukur residu zat sesudah dilakukan pengeringan di temperatur 105 °C sehingga berat menjadi konstan yang berbentuk nilai persen. Nilai susut pengeringan yang diperoleh dari simplisia serta ekstrak etanol kulit batang waru adalah sebanyak 8 % dan 3,3%. Massa yang bisa hilang sebab pemanasan tersebut mencakup pelarut etanol, minyak atsiri dan molekul air.

b. Kadar Air.

Tujuan penentuan kadar air adalah untuk memastikan berapa banyak air yang tersisa dalam bahan setelah pengeringan. Syarat kadar air tidak boleh melebihi 10%. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran kadar air menggunakan oven memperoleh hasil serbuk dan ekstrak kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) masing-masing mengandung 8% dan 5,5%.

c. Kadar Abu Total.

Penentuan kadar abu total dilakukan bertujuan mendeskripsikan kandungan mineral pada simplisia dan ekstrak. Kandungan abu total berkaitan dengan senyawa mineral anorganik (Depkes RI, 2000). Hasil kadar abu total serbuk dan ekstrak dari kulit batang waru adalah 8,78% dan 1,75%.

Uji Kandungan Kimia

a. Tujuan penapisan fitokimia adalah untuk mengetahui apakah suatu ekstrak mengandung golongan metabolit sekunder tertentu. Ini juga dapat berfungsi sebagai deskripsi kualitatif komposisi ekstrak. Komposisi kimia ekstrak etanol kulit batang waru diuji mengandung alkaloid, steroid/terpenoid, flavonoid, dan tanin (Guntarti *et al.*, 2015).

Tabel 3 Uji Tabung

No	Pemeriksaan	Cara Kerja	Hasil
1	Flavonoid	Ekstrak + HCl Pekat+Mg	(+) Terbentuk warna kuning

2	Alkaloid	Ekstrak+HCl +Mayer/Wagner/Dragendroff	(+) Mayer: Terbentuk endapan kuning (+) Wagner: Terbentuk endapan Coklat (+) Dragendrof: Terbentuk endapan jingga
3	Terpenoid	Ekstrak+lieberman-burchard	(+) Terbentuk warna merah kecoklatan
4	Saponin	Ekstrak + Akuades	(+) Terbentuk busa setinggi 1-10 cm
5	Tanin	Ekstrak +Akuades+FeCl ₃	(+) Terbentuk warna biru kehitaman

b. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Hasil skirining fitokimia yang dilakukan dengan menotolkan ekstrak kulit batang waru pada lempengan KLT ukuran 1x5 cm yang telah diberi garis batas elusi yang terdiri dari flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid/terpenoid

Tabel 4 Hasil KLT

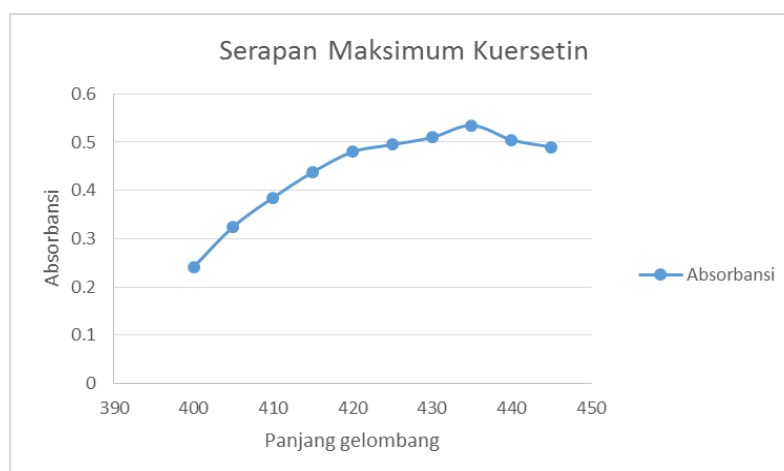
Senyawa	Perekasi	Warna	Rf
Flavonoid	Sitoborat	UV254 nm dan UV366 nm terlihat fluoresensis berwarna biru	0.5
Alkaloid	Dragendroff	UV254 nm dan UV366 nm terlihat fluoresensis berwarna biru atau kuning	0.5
Tanin	FeCl ₃	UV254 nm dan UV366 nm terlihat berwarna hitam	0.5
Steroid	Lieberman Buchard	Adanya noda berwarna merah kecoklatan ber fluoresensis hijau biru	0.8

Analisis Kuantitatif

1) Pengukuran Kuersetin

a. Hasil Penentuan Panjang Gelombang.

Panjang gelombang dari serapan maksimum kuersetin digunakan menentukan panjang dari gelombang yang digunakan pada tahap analisis kuantitatif.

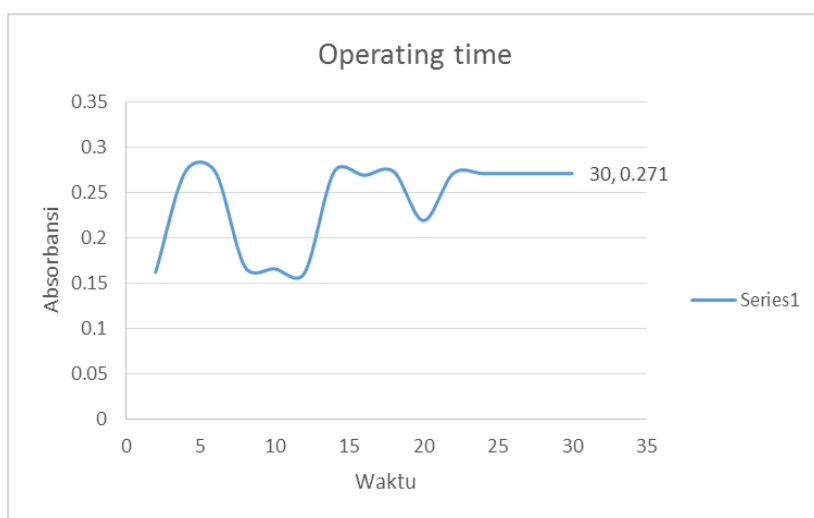


Gambar 1. Serapan Maksimum Kuersetin

Kesalahan dalam pembacaan penyerapan diminimalkan selama tahap ini. Spektrofotometer UV-Vis rentang serapan maksimum 400-440 nm untuk mengukur absorbansi dengan cara 1mL larutan kuersetin 20 ppm dan 1 mL larutan $C_2H_3NaO_2$ serta larutan $AlCl_3$. Hasil penelitian ini memperoleh panjang gelombang 435 nm.

b. Hasil Penentuan *Operating Time*

Operating time ini dimaksudkan untuk mengetahui waktu pengukuran yang lebih stabil ditandai dengan tidak terjadi lagi tingkat penurunan dari absorbansinya. *Operating time* dilakukan menggunakan larutan standart kuersetin 20 ppm. Pada penelitian ini memperoleh di menit 22, sebab diwaktu 22 menit mendapatkan absobransi yang stabil.



Gambar 2. Hasil Penentuan *Operating Time*

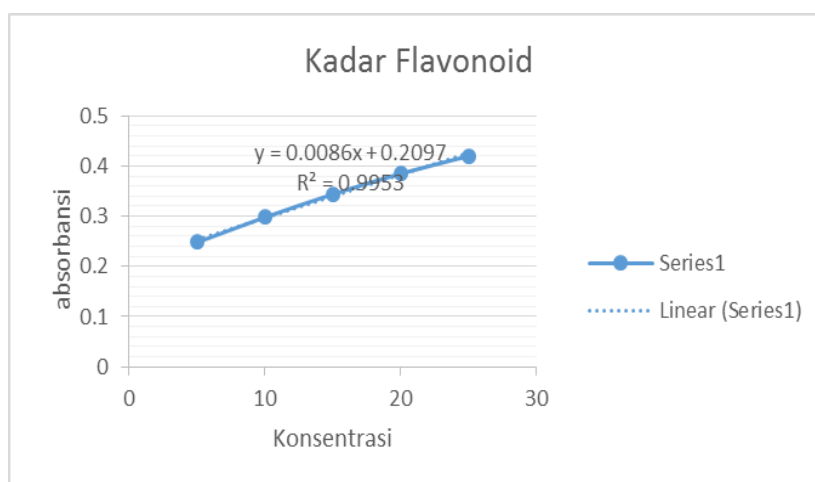
c. Pembuatan Kurva Baku

Larutan standart kuersetin memakai konsentrasi 100 ppm dibuat seri konsentrasi yakni 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 25 ppm yang masing-masing konsentrasi diambil 1 mL kemudian ditambahkan larutan 1 mL $AlCl_3$ dan juga 1 mL larutan $C_2H_3NaO_2$. Hasil pengukuran absorbansi standar kuersetin di λ maksimum yakni 435 nm.

Tabel 5 Kurva Kaliberasi

Konsentrasi	Abs
5	0.236
10	0.344
15	0.420
20	0.457
25	0.565

Tabel 5 menampilkan hasil nilai absorbansi dari larutan standar kuarsetin memakai spektrofotometri UV- VIS dan bersumber pada data hasil perhitungan regresi linear pembanding kuarsetin diperoleh persamaan regresi linear yakni $Y=0,0086x+ 0,2097$. Koefisien korelasi(R^2)= 0,9953.



Gambar 3. Regresi linear larutan standar kuersetin

d. Pengukuran Kadar Flavonoid

Pengukuran kadar flavonoid ditunjukkan pada tabel 6 beserta hasil analisis kandungan total senyawa flavonoid total berupa flavon dan flavonol yang dihitung pada % b/b.

Tabel 6. Hasil Pengukuran Kadar Flavonoid

Replikasi	Absorbansi	Rata-rata	Kadar Kuersetin	Mg Sampel	QE/g	SD	Rata-rata ± SD
1	0.313	0.31267	12.012	11.973	0.055	0.055	11.973 ± 0.055
2	0.312		11.895				
3	0.313		12.012				

Kadar flavonoid total yang berasal dari ekstrak etanol kulit batang waru adalah sebesar 11.973 ± 0,055 yang dihitung terhadap kuersetin. Standar deviasi, yang dihitung dengan menggunakan ketiga nilai kandungan flavonoid total (EK) mg/g ekstrak sama dengan 0,005.

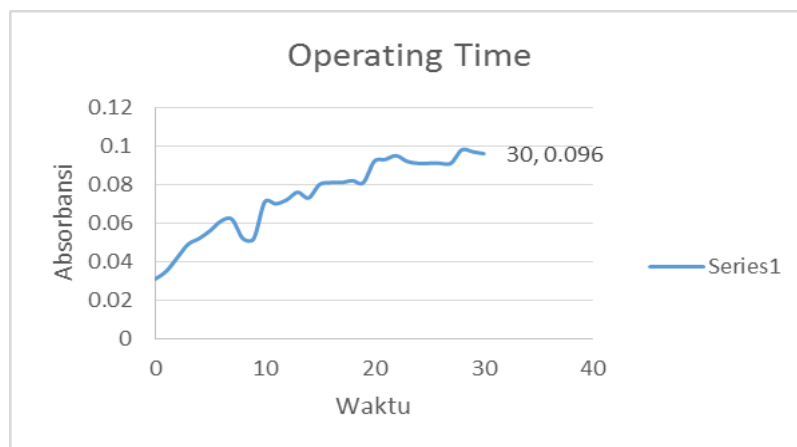
2) Pengukuran Antioksidan dengan ABTS

1. Hasil Penentuan Panjang Gelombang

Hasil pengukuran serapan maksimum larutan ABTS diambil 1 mL ditambahkan PBS pH7,4 hingga 25 mL dengan menggunakan spektrofotometri UV-VIS. Hasil pengukuran menunjukkan bahwa larutan ABTS mempunyai panjang gelombang 730 nm.

2. Hasil Penentuan *Operating Time*

Waktu *operating time* ditentukan dengan mengukur hubungan antara waktu pengukuran dengan absorbansi larutan (Rohman, 2007). Pada penelitian ini memperoleh di menit ke 24, sebab diwaktu 24 menit mendapatkan absobransi yang stabil. dengan cara larutan standar kuersetin 15 ppm diambil 0,1 mL ditambahkan 2 mL larutan ABTS yang diukur dengan panjang gelombang 730 nm menggunakan waktu selama 30 menit sampai diperoleh absorbansi stabil.



Gambar 4. Penentuan Operating Time

3. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan

Pengujian absorbansi ABTS dilakukan pada ekstrak serta fraksi dengan deret konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, dan 50 ppm tahap selanjutnya ditambahkan 1 mL larutan ABTS di setiap konsentrasi serta dibaca absorbansinya di panjang gelombang 730 nm. Pembacaan absorbansi di penelitian ini dilakukan pada saat operating time yang sudah ditentukan yaitu menit ke-24 kemudian dihitung persen peredamannya.

Tabel 7. Hasil Penentuan Aktivitas Antioksidan

Larutan Uji	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Absorbansi	% Inhibisi
Fraksi Air	10	0.327	26.067
	20	0.318	29.213
	30	0.293	33.708
	40	0.272	38.876
	50	0.250	44.045
Fraksi n-Heksan	10	0.355	20.225
	20	0.343	23.146
	30	0.327	26.742
	40	0.313	29.213
	50	0.275	32.809
Fraksi Etil-Asetat	10	0.238	46.966
	20	0.237	47.865
	30	0.229	48.764
	40	0.226	49.880
	50	0.221	51.011
Ekstrak	10	0.332	25.843
	20	0.319	28.539
	30	0.297	33.258
	40	0.280	37.079
	50	0.262	41.798
Baku	5	0.235	48.315
Pembanding	10	0.197	55.506
	15	0.182	59.775
	20	0.154	66.067
	25	0.131	71.011

IC₅₀ (*Inhibition Concentration*) dapat digunakan untuk menyatakan aktivitas antioksidan ekstrak kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), fraksi air, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan kuersetin. Konsentrasi sampel yang dikenal sebagai IC₅₀ diperlukan untuk dapat menangkap 50% radikal bebas ABTS selama *operating time*. Data ekstrak kulit kayu waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan standar dari perbandingan quercetin digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ menggunakan persamaan regresi linier dan rumus $Y = a + b$.

Tabel 8. Nilai IC₅₀ Ekstrak Kulit Kayu Waru dengan Pembanding Kuersetin

Fraksi air	64.23
Fraksi n-Heksan Fraksi Etil asetat	105.45
Ekstrak Kulit Batang Waru Baku	40.90
Pembanding	
Kuersetin	71.28
Baku Pembanding Kuersetin	6.095

Nilai IC₅₀ sebesar 40, 90 ppm yang setara dengan nilai kuersetin di dasar 50 ppm, hasil pengujian menampilkan jika fraksi etil asetat mempunyai aktifitas antioksidan karena adanya molekul flavonoid dalam fraksi etil asetat, yang akan membatasi reaksi dari oksidasi dengan mekanisme radikal dan fenolik paling efisien.

KESIMPULAN

Kadar flavonoid dari ekstrak etanol kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) ialah sebesar 11.973 ± 0.055 QE. Aktivitas antioksidan ekstrak dari etanol fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air kulit batang waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) metode ABTS menunjukkan bahwa semuanya mempunyai aktivitas antioksidan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani, Y., Mohamad, H., Bhubalan, K., Abdullah, M., & Amir, H. (2017). Phytochemical analyses, anti-bacterial and anti-biofilm activities of mangrove-associated *Hibiscus tiliaceus* extracts and fractions against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Sustainability Science and Management*, 12, 45–51.
- Depkes RI. (2000). *Parameter Standart Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Faisal, H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L . Moench) Dengan Metode DPPH (1 , 1- difenil-2-pikrilhidrazil) dan Metode ABTS. *Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*, 2 (1), 1–5.
- Kumar, S., Kumar, D., & Prakash, O. (2008). Evaluation of antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents of *Hibiscus tiliaceus* flowers. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 7(4), 2863–2871.
- Muthmainnah B. (2017). Skrining Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak Etanol Buah Delima (*Punica Granatum* L.) Dengan Metode Uji Warna. *Media Farmasi*, XIII(December).
- Rao, R. S. P., & Møller, I. (2011). Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. *Proteomics*, 11, 4166–4173. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100223>
- Rohman, A. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar.

- Soeksmanto, Arif Hapsari, Yatri Simanjuntak, P. (2007). Antioxidant content of parts of Mahkota dewa, *Phaleria macrocarpa* [Scheff] Boerl. (Thymelaceae). *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 8(2), 92–95. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d080203>
- Vifta, R. L., & Advistasari, Y. D. (2018). Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* B.). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 8–14.