

## UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL LIMBAH KULIT BUAH APEL (*Malus domestica* Borkh.) TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil)

Submitted : 17 Mei 2016

Edited : 19 Mei 2016

Accepted : 25 Mei 2016

Ratih Dyah Pertiwi<sup>1,3</sup>, Cut Ervinar Yari<sup>2,3</sup>, Nanda Franata Putra<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kesehatan Masyarakat, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Esa Unggul, Jakarta

<sup>2</sup>Jurusan Anafarma, Fakultas Kesehatan Universitas MH Thamrin, Jakarta

<sup>3</sup>Akademi Farmasi Hang Tuah, Jakarta

Email : rpertiwy@yahoo.com

### ABSTRACT

Recently, many plants have not been utilized properly, one of those is apple plant. There are several types of apples which are widely consumed and used as processed products, among others, as candied apples, syrup and fruit juice. The effluent from the process in the form of processed peel and pulp is not only used as a substitute for animal feed and fertilizer plants, but also used as a natural antioxidant that is needed by the human body against various free radical. Most of the people who like to consume apples prefer to discard the apple peel without using it. Apple peel contains quercetin substances, which needed to increase the levels of antioxidants. The preparation of ethanol extract from apple peels waste is used by maceration method using solvent 70% ethanol. To test the antioxidant activity towards free radical DPPH the extract was made into several concentrations, namely 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm and 60 ppm, and than mixed with a solution of DPPH with concentration of 100 ppm. The absorbance was measured using a spectrophotometer UV-Visible. Based on the result of the research, the percentage of reduction obtain from those of extract concentrations were 8.580%, 14.510%, 21.653%, 26.685% and 34,232%. From percentage reduction result, it was obtain  $IC_{50}$  in the amount of 87.795 ppm. Based on the  $IC_{50}$  values can be concluded that the ethanol extract of apple peel waste has strong antioxidant activity classification.

**Keywords :** Antioxidant Activity, Apple Peel Waste, DPPH

### PENDAHULUAN

Banyak buah ataupun bagian dari tanaman yang sampai saat ini belum dimanfaatkan dengan baik, termasuk pengolahan limbah atau kulit dari buah tersebut. Tanaman apel merupakan salah satu jenis tanaman buah yang banyak dan mudah tumbuh di daerah tropis termasuk Indonesia, diantaranya di daerah Batu

(Malang), Pasuruan, Lumajang dan beberapa dataran tinggi yang tidak banyak berkabut. Ada beberapa jenis buah apel yang banyak dikonsumsi, sedangkan beberapa lainnya digunakan sebagai produk olahan, antara lain sebagai buah kaleng, "manisan apel", sirup, jus dan sari buah. Buangan dari proses olahan yang berupa kulit dan ampas, selama

ini hanya digunakan sebagai substitusi pakan ternak dan pemupukan tanaman<sup>(1)</sup>.

Pada dasarnya limbah kulit buah apel tidak hanya digunakan sebagai substitusi pakan ternak dan pemupukan tanaman, akan tetapi limbah kulit buah apel juga dapat digunakan sebagai bahan antioksidan alami yang sangat dibutuhkan oleh tubuh terutama pada kulit untuk melawan berbagai radikal bebas dari luar. Sebagian besar masyarakat yang gemar mengonsumsi buah apel lebih suka mengupas kulitnya dan membuang kulit buah apel tersebut tanpa memanfaatkannya.

Berdasarkan hasil isolasi senyawa dalam kulit apel, diperoleh senyawa 19 dan senyawa 20 yaitu senyawa berbentuk bubuk kuning pucat yang diidentifikasi sebagai 3,5,7,3',4'-pentahydroxy-flavonol-3-O-*-D-galactopyranoside* yang identik dengan data yang dilaporkan dalam literatur merupakan *quercetin-3-O- -D-galactopyranoside* dan *quercetin-3-O- -D-glucopyranoside*<sup>(2)</sup>.

Kulit apel mengandung kuersetin zat yang dibutuhkan guna meningkatkan kadar antioksidan guna mencegah berbagai macam penyakit. Hasil penelitian menyatakan bahwa hanya kulit apel, buah yang memiliki kuersetin. Itu sama artinya apel mampu menyediakan antioksidan setara 1.500 mg vit. C dari ekstrak apel segar dari apel ukuran medium<sup>(3)</sup>.

Kuersetin merupakan golongan senyawa flavonol yang paling banyak terdapat di alam dari pada jenis flavonoid yang lain. Kuersetin terdapat di buah apel yang berfungsi sebagai antioksidan dan anti aging<sup>(4)</sup>.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka diadakan penelitian dengan judul "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.) Terhadap Radikal Bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) Secara Spektrofotometri UV-Visibel", sehingga dapat diketahui bahwa manfaat limbah kulit

apel tersebut dapat dijadikan antioksidan alami yang dapat melawan berbagai radikal bebas.

## BAHAN DAN METODE PENELITIAN

### Alat

Wadah Maserator, Rotary Evaporator, Spektrofotometer UV-Visibel, Kompor/ Penangas, Labu ukur, Vial, Mikro Pipet, saringan, Bola Karet, Aluminium Foil, TLC Sillica Gel 60 F<sub>254</sub>, Bak Kromatografi

### Bahan

Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.), Etanol 70%, Metanol p.a, DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil), Blanko Positif Kuersetin Standar (Sigma Aldrich), NaOH 1N, HCl 2N, HCl Pekat, Kloroform

### Metode

Pembuatan Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel

1. Siapkan alat dan bahan.
2. Timbang Limbah kulit buah apel yang telah dikeringkan sebanyak 500 gram masukkan ke dalam wadah proses ekstraksi.
3. Tambahkan etanol 70% ke dalamnya sampai semua simplisia terendam, kemudian tutup dengan aluminium foil dan biarkan selama 4 hari.
4. Saring sampai di dapat maserat 1.
5. Ampas dimasukkan kembali kedalam wadah proses ekstraksi dan tambahkan etanol 70% sampai semua simplisia terendam, kemudian tutup dengan aluminium foil dan biarkan selama 3 hari.
6. Saring kembali sampai didapat maserat 2.
7. Kumpulkan maserat 1 dan 2 dan uapkan maserat tersebut dengan alat rotavapor dan kompor/penangas, sehingga di peroleh hasil ekstrak kental Limbah kulit buah apel.

Identifikasi Senyawa Flavonoid dalam Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel Secara Kimia Kualitatif<sup>(5)</sup>.

1. Timbang ekstrak kental limbah kulit buah apel sebanyak 1 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer. Tambahkan 1 mL sampai 2 mL etanol (95%) P, kemudian aduk hingga larut.
2. Saring filtrat menggunakan kertas saring.
3. Ukur filtrat sebanyak 1 mL, kemudian masukkan ke dalam cawan uap.
4. Tambahkan 0.05 gram serbuk seng p.a.
5. Tambahkan 2 mL HCl 2N, kemudian diamkan selama 1 menit.
6. Tambahkan 10 tetes HCl pekat P, kemudian diamkan selama beberapa menit.
7. Jika dalam waktu 2 sampai 5 menit terjadi warna jingga sampai warna merah intensif, menunjukkan adanya flavonoid (glikosida-3-flavonol).
8. Setelah terjadi perubahan warna jingga sampai warna merah intensif, pindahkan larutan uji kedalam tabung reaksi agar warna lebih mudah diamati.

Identifikasi senyawa Flavonol golongan Flavonoid dalam Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel Secara Kimia Kualitatif<sup>(4)</sup>.

1. Timbang ekstrak kental limbah kulit buah apel sebanyak 1 gram, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer.
2. Tambahkan 1 mL sampai 2 mL etanol (95%) P, kemudian aduk hingga larut.
3. Saring filtrat menggunakan kertas saring.
4. Ukur filtrat sebanyak 1 mL, kemudian masukkan ke dalam tabung reaksi.
5. Tambahkan 1 mL sampai 2 mL *Amyl alcohol*, kemudian diamkan selama 5 menit.
6. Tambahkan 10 tetes NaOH 1N.
7. Terjadi warna kuning intensif pada lapisan *Amyl alcohol* menunjukkan adanya Flavonol.

Identifikasi senyawa Kuersetin dalam ekstrak Limbah Kulit Buah Apel Secara Kromatografi Lapis Tipis

1. Timbang 10 mg Kuersetin Standar masukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan tambahkan metanol p.a hingga tanda batas, tandai sebagai larutan perbandingan kuersetin standar.
2. Timbang 10 mg ekstrak kental limbah kulit buah apel masukkan ke dalam labu ukur 10 mL dan tambahkan metanol p.a hingga tanda batas, tandai sebagai larutan uji.
3. Jenuhkan bak kromatografi menggunakan metanol p.a sebanyak 10 mL kemudian masukkan kertas saring ke dalam bak kromatografi lalu tunggu hingga bak kromatografi jenuh yang di tandai dengan basahanya kertas saring yang ada di dalam bak kromatografi tersebut.
4. Pembuatan eluen (Fase gerak) yaitu Kloroform : Metanol p.a (9 : 1) masukkan ke dalam bak kromatografi.
5. Siapkan (Fase diam) yaitu lempeng kromatografi Sillica Gel 60 F<sub>254</sub> lalu tolkan larutan perbandingan dan larutan uji, kemudian masukkan lempeng kromatografi ke dalam bak kromatografi.
6. Setelah terjadinya rambatan pada lempeng kromatografi lihat rambatan noda pada lampu UV pada panjang gelombang 254 nm, kemudian tandai noda yang merambat dan hitung nilai Rf dari rambatan noda tersebut.

Uji Aktivitas Antioksidan menggunakan metode DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*)<sup>(6)</sup>.

1. Pembuatan Larutan Induk DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*)
  - a. Siapkan alat dan bahan.
  - b. Timbang dengan seksama kurang lebih 10,0 mg DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*).

- c. Masukkan ke dalam botol berwarna gelap 100,0 mL.
  - d. Tambahkan dengan metanol p.a hingga tanda batas sehingga didapatkan larutan DPPH dengan konsentrasi 100 ppm.
2. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*)
    - a. Siapkan alat dan bahan.
    - b. Dari larutan induk tersebut, dipipet sebanyak 1 mL DPPH, masukkan kedalam vial dan tambahkan 3 mL metanol p.a.
    - c. Kocok hingga homogen menggunakan vortex selama 10 detik.
    - d. Masukkan ke dalam inkubator bersuhu 370C selama 30 menit.
    - e. Tentukan panjang gelombang menggunakan spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang ( ) 400 nm hingga 800 nm.
  3. Pembuatan Larutan Induk Blanko Positif Kuersetin
    - a. Siapkan alat dan bahan.
    - b. Timbang kuersetin sebanyak 10,0 mg dan masukkan kedalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan metanol p.a hingga tanda batas 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.
    - c. Dari larutan induk tersebut, dibuat konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 30 ppm dengan memipet masing-masing 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, dan 150  $\mu$ L dan tambahkan metanol p.a hingga tanda batas 5 mL lalu kocok hingga homogen kemudian masukkan ke dalam vial.
  4. Pengujian Aktivitas Antioksidan Blanko Positif Kuersetin
    - a. Siapkan alat dan bahan.
    - b. Ukur masing – masing larutan uji kuersetin sebanyak 1,0 mL dan masukkan ke dalam vial.
    - c. Kemudian masing-masing vial ditambahkan 1,0 mL larutan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*) dan 2,0 mL metanol p.a.
    - d. Masukkan ke dalam inkubator bersuhu 370C selama 30 menit, lakukan sebanyak 3 kali (triplo).
    - e. Serapan larutan uji diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dengan rentang absorban ( ) 400 nm – 800 nm.
  5. Pembuatan Larutan Sampel (Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel)
    - a. Timbang ekstrak kulit buah apel sebanyak 10,0 mg dan masukkan kedalam labu ukur 10 mL, kemudian tambahkan metanol p.a hingga tanda batas 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm.
    - b. Siapkan labu terukur 5 mL sebanyak tujuh buah.
    - c. Sampel dipipet dengan sejumlah volume tertentu yaitu 50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 150  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 300  $\mu$ L dan masukkan kedalam masing – masing labu ukur 5 mL, kemudian masukkan ke dalam vial.
    - d. Masing-masing sampel ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas yaitu 5 mL sehingga dihasilkan larutan sampel dengan beberapa konsentrasi yaitu 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 60 ppm.
  6. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel
    - a. Ukur masing-masing larutan uji sebanyak 1,0 mL dan masukkan ke dalam vial.
    - b. Tambahkan 1,0 mL larutan DPPH (*2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil*) dan 2,0 mL metanol p.a.

- c. Masukkan ke dalam inkubator bersuhu 370C selama 30 menit, lakukan sebanyak 3 kali (triplo).
- d. Serapan larutan uji diukur menggunakan spektrofotometer UV-Visibel dengan rentang absorban ( ) 400 nm – 800 nm.

**Analisa Data**

**Pengukuran Serapan Sampel**

Dari data absorbansi yang didapat kemudian dihitung persentase inhibisi sampel dan Vitamin C terhadap radikal bebas DPPH. Nilai IC<sub>50</sub> dihitung dari masing – masing konsentrasi larutan sampel dengan rumus sebagai berikut<sup>(7)</sup> :

$$\text{Persentase Inhibisi} = \frac{s - k - s}{s - k} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentasi inhibisi dari masing – masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan y = a + bx dengan perhitungan secara regresi linier dimana :

- x : konsentrasi (µg/ml).
- y : persentase inhibisi (%).

Aktivitas antioksidan dinyatakan dengan *Inhibition Concentration* 50% (IC<sub>50</sub>) yaitu konsentrasi sampel dapat meredam radikal DPPH sebanyak 50%. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**Hasil Ekstraksi**

Ekstrak limbah kulit buah apel didapat melalui proses maserasi. Dari 500 gram limbah kulit buah apel yang telah dikeringkan kemudian di maserasi dengan etanol 70% selama 3x24 jam dan dilakukan secara duplo (2 kali), sehingga diperoleh 153.78 gram ekstrak kental limbah kulit buah apel, dengan warna coklat tua dan berbau khas sebagaimana tertera pada tabel

- 1. Rendemen yang dihasilkan yaitu 30,74 % (tabel 1)

**Tabel 1.** Klasifikasi Ekstrak etanol Limbah Kulit Buah Apel

Berat Simplisia Limbah Kulit Buah Apel (gram)	Hasil Ekstrak Etanol (gram)	Organoleptis	
		Warna	Bau
500	153.78	Cokelat Tua	Khas

Limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) dikeringkan agar kandungan airnya berkurang supaya tidak mengganggu proses ekstraksi, kemudian di blender kasar agar *menstrum* atau cairan penyari mudah masuk kedalam pori-pori yang kosong dan melarutkan zat yang larut. Simplisia yang telah di blender kasar dimaserasi dengan menggunakan *menstrum* atau cairan penyari berupa campuran etanol dengan air. Etanol 70% merupakan campuran dari 70% etanol 96% dan 30% akuades. Etanol 70% digunakan untuk menarik kandungan kimia yang terdapat dalam simplisia agar didapatkan bahan aktif yang optimal, dimana hanya terdapat sedikit pengotor yang ikut dalam cairan penyari<sup>(8)</sup>.

Metode ekstraksi yang digunakan yaitu ekstraksi dingin secara maserasi. Metode ini dipilih karena merupakan metode yang paling sederhana, alatnya mudah didapatkan, dan tidak merusak kandungan senyawa yang tidak tahan panas. Prinsip maserasi adalah dengan cara merendam bahan uji dalam cairan penyari sampai meresap dan melunakkan susunan sel sehingga zat-zat yang terkandung didalamnya mudah tersari dengan baik<sup>(9)</sup>.

Pada penelitian ini digunakan cairan penyari etanol 70% yaitu merupakan campuran dari 70% etanol 96% dan 30%

akuades karena ekonomis, mudah didapatkan, serta berfungsi untuk mencegah pertumbuhan kuman dan kapang, karena kapang sulit tumbuh pada etanol 70% ke atas, selain itu tidak beracun, netral, absorpsinya baik, dan etanol dapat bercampur baik dengan air pada segala perbandingan serta tidak memerlukan pemanasan yang tinggi. Etanol merupakan pelarut yang bersifat polar dan flavonoid juga senyawa yang bersifat polar. Dengan merendam simplisia limbah kulit buah apel dalam pelarut ini, diharapkan senyawa antioksidan dari jenis flavonoid dapat larut dengan baik didalamnya<sup>(9)</sup>.

Etanol yang ada pada ekstrak dihilangkan dengan menggunakan Rotavapor (*Rotary Evaporator*). Hasil ekstraksi dari 500 gram simplisia limbah kulit buah apel menghasilkan ekstrak kental sebesar 153.78 gram. Setelah didapat jumlah ekstrak kental dilakukan perhitungan persen rendemen ekstrak dengan membagi jumlah ekstrak dengan bobot simplisia. Dari hasil perhitungan persen rendemen yang dihasilkan yaitu sebesar 30.74%.

### **Identifikasi Senyawa Kimia Flavonoid dan Flavonol Dalam Simplisia Dan Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.)**

#### **Secara Kimia Kualitatif**

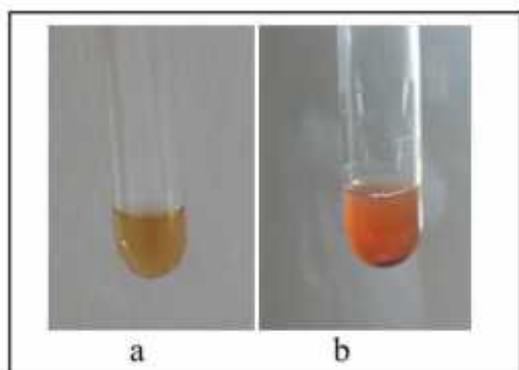
Hasil Identifikasi senyawa kimia flavonoid dan flavonol dalam simplisia dan ekstrak limbah kulit buah apel yang dilakukan secara kimia kualitatif, menunjukkan hasil larutan berwarna merah menandakan adanya zat flavonoid pada simplisia dan ekstrak etanol limbah kulit buah apel. Identifikasi flavonol menunjukkan hasil kuning pada lapisan *Amyl alcohol* menandakan adanya zat flavonol pada simplisia dan ekstrak etanol

limbah kulit buah apel. Hasil identifikasi dapat dilihat pada tabel.2. Identifikasi senyawa kimia flavonoid dan senyawa flavonol golongan flavonoid pada simplisia limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) dilakukan secara identifikasi kimia kualitatif. Identifikasi senyawa flavonoid digunakan pereaksi yaitu *Zinc powder* p.a, Asam Klorida (HCl) 2N dan Asam Klorida (HCl) pekat. Identifikasi senyawa flavonol golongan flavonoid digunakan pereaksi yaitu *Amyl alcohol*, dan Natrium Hidroksida (NaOH) 1N.

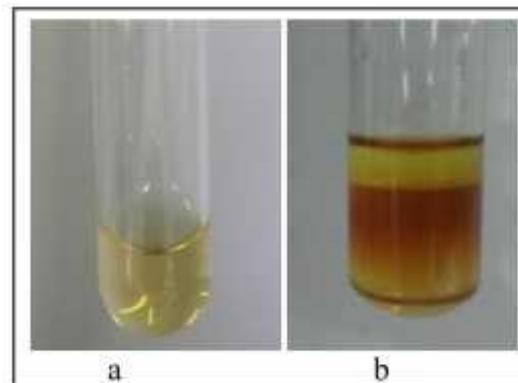
Pada proses identifikasi senyawa kimia simplisia terlebih dahulu diserbukkan hingga halus kemudian di masukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian tambahkan etanol 96% lalu kocok selama 5 menit. Pengocokan selama 5 menit dilakukan berdasarkan hasil optimasi dimana 5 menit adalah waktu yang ideal dalam melarutkan simplisia, pengocokkan selama 5 menit diharapkan senyawa kimia yang akan diidentifikasi khususnya senyawa flavonoid dan senyawa flavonol dapat larut dalam etanol tersebut, setelah di kocok selama 5 menit filtrat disaring menggunakan kertas saring supaya ampas simplisia dapat terpisah dengan filtrat sehingga hanya sedikit pengotor yang dapat mengganggu proses identifikasi. Identifikasi senyawa flavonoid pada simplisia di dapatkan hasil larutan berwarna merah namun warna merah tersebut tidak terlalu terlihat intensif dikarenakan pada waktu proses pengocokkan yang kurang maksimal sehingga hanya sedikit senyawa flavonoid yang larut dalam pelarutnya serta pada saat identifikasi terdapat pengotor atau zat-zat lain yang ikut teridentifikasi saat ditambahkan pereaksi. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar 1.

**Tabel 2.** Hasil Uji Identifikasi Senyawa Flavonoid Dan Flavonol

No.	Identifikasi	Prosedur	Hasil
1.	Flavonoid	Simplisia + Etanol → Saring + 50 mg Zinc p.a + 2 mL HCl 2N + 10 tetes HCl Pekat → Diamkan beberapa menit	Larutan Warna Merah
	Flavonol	Simplisia + Etanol → Saring + 2 mL <i>Amyl alcohol</i> → diamkan selama 5 menit + 10 tetes NaOH 1N	Kuning Pada Lapisan <i>Amyl alcohol</i>
2.	Flavonoid	Ekstrak + Etanol → Saring + 50 mg Zinc p.a + 2 mL HCl 2N + 10 tetes HCl Pekat → Diamkan beberapa menit	Larutan Warna Merah
	Flavonol	Ekstrak + Etanol → Saring + 2 mL <i>Amyl alcohol</i> → diamkan selama 5 menit + 10 tetes NaOH 1N	Kuning Pada Lapisan <i>Amyl alcohol</i>



**Gambar 1.** Hasil Identifikasi senyawa flavonoid pada simplisia limbah kulit buah apel (a) sebelum ditambah pereaksi (b) sesudah ditambah pereaksi

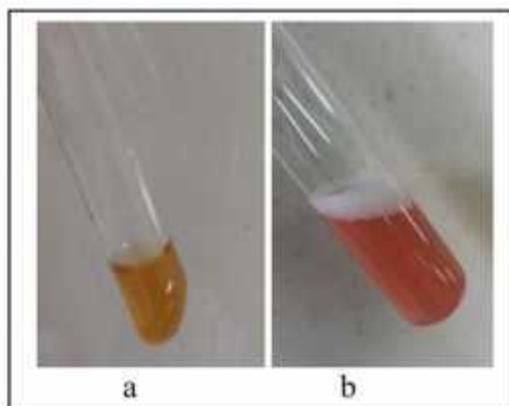


**Gambar 2.** Hasil Identifikasi senyawa flavonol pada simplisia limbah kulit buah apel (a) sebelum ditambah pereaksi (b) sesudah ditambah pereaksi

Identifikasi senyawa flavonol golongan flavonoid pada simplisia setelah filtrat disaring dilakukan penambahan *Amyl alcohol* dengan tujuan agar senyawa flavonol dapat teridentifikasi yang ditandai dengan warna kuning pada lapisan *Amyl alcohol*, pada identifikasi senyawa flavonol golongan flavonoid ini didapatkan hasil warna kuning pada lapisan *Amyl alcohol*. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar 2.

Identifikasi senyawa flavonoid dan senyawa flavonol golongan flavonoid pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) dilakukan secara kimia kualitatif. Identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak digunakan pereaksi yang sama seperti identifikasi pada simplisia yaitu *Zinc powder* p.a, Asam Klorida (HCl) 2N dan Asam Klorida (HCl) pekat. Untuk identifikasi senyawa flavonol golongan flavonoid juga digunakan pereaksi yang sama seperti identifikasi pada simplisia yaitu *Amyl alcohol*, dan Natrium Hidroksida (NaOH) 1N. Untuk identifikasi senyawa flavonoid maupun senyawa flavonol

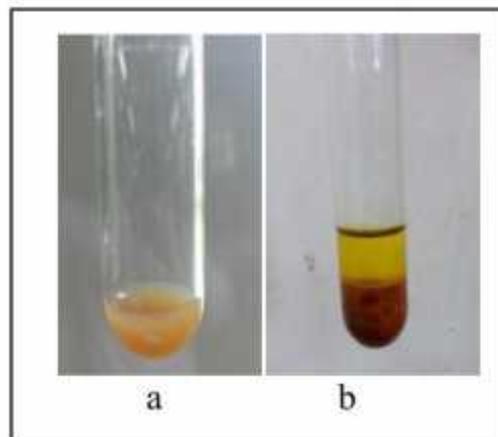
golongan flavonoid pada ekstrak dilakukan perbedaan pada pembuatan filtrat dengan identifikasi pada simplisia, untuk pembuatan filtrat ekstrak terlebih dahulu dilarutkan menggunakan etanol 96% kemudian disaring menggunakan kertas saring supaya hanya sedikit pengotor atau zat-zat lain yang dapat mengganggu proses identifikasi. Identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak didapatkan hasil larutan berwarna merah dan larutan tersebut terlihat lebih intensif dibandingkan hasil identifikasi pada simplisia, hal ini dikarenakan senyawa flavonoid yang larut pada saat proses maserasi lebih banyak dibandingkan senyawa flavonoid yang larut saat proses pengocokan selama 5 menit. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar 3.



**Gambar 3.** Hasil Identifikasi senyawa flavonoid pada ekstrak limbah kulit buah apel (a) sebelum ditambah pereaksi (b) sesudah ditambah pereaksi

Identifikasi senyawa flavonol golongan flavonoid pada ekstrak didapatkan hasil warna kuning pada lapisan *Amyl alcohol* yang juga terlihat lebih intensif dibandingkan hasil identifikasi pada simplisia, hal ini juga dikarenakan senyawa flavonoid yang larut pada saat proses maserasi lebih banyak dibandingkan senyawa flavonoid yang larut saat proses

pengocokkan selama 5 menit. Hasil identifikasi dapat dilihat pada gambar 4.



**Gambar 4.** Hasil Identifikasi senyawa flavonol pada ekstrak limbah kulit buah apel (a) sebelum ditambah pereaksi (b) sesudah ditambah pereaksi

#### Secara Kimia Kuantitatif (Kadar Flavonoid)

Dari hasil penelitian yang dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri didapatkan kadar flavonoid sebesar 0.73 %. Kadar tersebut didapat dari hasil pengujian pada ekstrak kental limbah kulit buah apel sebanyak 1.0088 gram. Pengujian kadar flavonoid dilakukan di Kementerian Pertanian, Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITRO), Bogor, Jawa Barat.

#### 1. Identifikasi Senyawa Kuersetin Dalam Ekstrak Limbah Kulit Buah Apel Secara Kromatografi Lapis Tipis

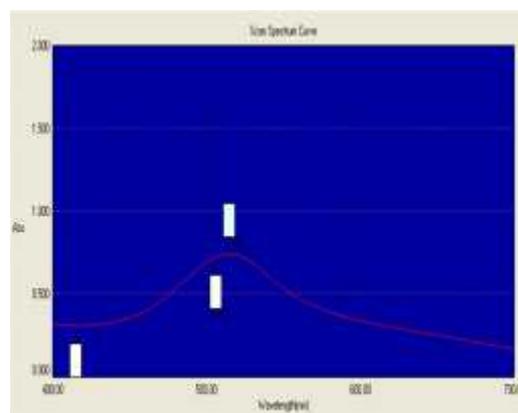
Pada hasil identifikasi senyawa kuersetin dalam ekstrak limbah kulit buah apel secara kromatografi lapis tipis, dengan pengamatan kromatogram dibawah sinar UV 254 nm terlihat noda berwarna kuning yang bisa dipakai sebagai petunjuk positif adanya kuersetin. Harga Rf sampel sebesar 0.85 sedangkan harga Rf kuersetin standar sebesar 0.87. Harga Rf yang saling

mendekati menunjukkan bahwa di dalam ekstrak limbah kulit buah apel terdapat kandungan senyawa kuersetin.

Pemeriksaan atau identifikasi senyawa kuersetin pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) dilakukan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pemeriksaan ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui apakah pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel terdapat senyawa kuersetin atau tidak. Identifikasi ini menggunakan TLC Silica Gel 60 berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm sebagai fase diam dikarenakan lempeng silica gel tersebut dapat berfluoresensi pada panjang gelombang 254 nm sehingga noda akan terlihat jelas pada panjang gelombang tersebut. Eluen atau fase gerak pada identifikasi ini digunakan MeOH dan CHCl<sub>3</sub> dengan perbandingan (9:1), pemilihan eluen ini dikarenakan mengingat sifat kelarutan dari senyawa kuersetin tersebut. Hasil identifikasi senyawa kuersetin pada ekstrak secara Kromatografi Lapis Tipis digunakan kuersetin murni sebagai pembanding sekaligus sebagai penentuan nilai R<sub>f</sub> standar dari senyawa kuersetin tersebut. Hasil yang didapat yaitu ditentukan melalui perbandingan nilai R<sub>f</sub> pada kuersetin murni dan nilai R<sub>f</sub> pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel, pada kuersetin murni didapatkan nilai R<sub>f</sub> sebesar 0.87 dan pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel didapatkan nilai R<sub>f</sub> sebesar 0.85. Perbedaan nilai R<sub>f</sub> antara kuersetin standar dan nilai R<sub>f</sub> ekstrak etanol limbah kulit buah apel yang tidak jauh berbeda dapat membuktikan bahwa pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel terdapat senyawa kuersetin.

## 2. Spektrum atau Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Hasil pengukuran spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang maksimum larutan induk DPPH 100 ppm pada rentang panjang gelombang 400-800 nm, berdasarkan optimasi yang dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimal adalah 515 nm dengan absorbansi tertinggi yaitu 0.742. Hasil spektrum atau panjang gelombang maksimum DPPH dapat dilihat pada gambar 5.



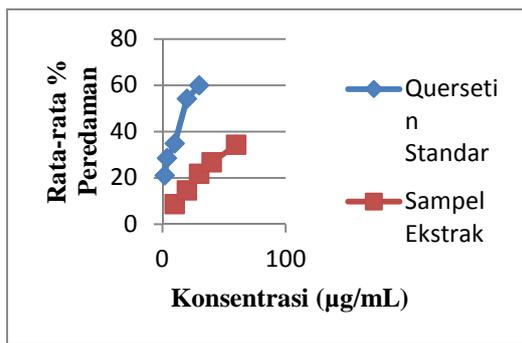
**Gambar 5.** Hasil spektrum DPPH

## 3. Pengujian Aktivitas Antioksidan Kuersetin Standar

Hasil uji aktivitas antioksidan kuersetin standar yang diukur pada panjang gelombang 515 nm dalam berbagai konsentrasi dapat dilihat pada gambar 6, klasifikasi aktivitas antioksidan dapat dilihat pada tabel 3.

## 4. Pengujian Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Apel (*Malus domestica* Borkh.)

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol limbah kulit buah apel yang diukur pada panjang gelombang 515 nm dalam berbagai konsentrasi dapat dilihat pada gambar 6, klasifikasi aktivitas antioksidan dapat dilihat pada tabel 3.



**Gambar 6.** Grafik rata-rata % peredaman Kuersetin Standar dan Ekstrak Etanol Limbah Kulit Buah Apel

5. Menentukan Nilai Inhibition Concentration 50% (IC<sub>50</sub>)

Dari hasil pengujian aktivitas antioksidan didapatkan persentase peredaman dari masing-masing bahan uji. Setelah didapatkan persentase peredaman dari masing-masing bahan uji, tentukan nilai IC<sub>50</sub> dari masing-masing bahan uji. Hal ini diperoleh dari persamaan regresi linier dari masing-masing bahan uji. Nilai IC<sub>50</sub> didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50. Hasil persamaan regresi linier, nilai IC<sub>50</sub> dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 3.** Klasifikasi Antioksidan Bahan Uji<sup>(6)</sup>

No.	Nama Bahan Uji	Klasifikasi Antioksidan			
		Sangat Kuat	Kuat	Sedang	Lemah
1.	Kuersetin Standar	20.604	-	-	-
2.	Ekstrak etanol limbah kulit buah apel	-	87.795	-	-

Sangat kuat < 50 µg/mL    Sedang : 100-150 µg/mL  
 Kuat : 50-100 µg/mL    Lemah : 151-200 µg/mL

**Tabel 4.** Persamaan Linier dan IC<sub>50</sub> Kuersetin standar dan Ekstrak etanol limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.)

No.	Nama Bahan Uji	Persamaan Linier	R	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
1.	Kuersetin Standar	y=1.3968x + 21.221	0.9788	20.604
2.	Ekstrak etanol limbah kulit buah apel	y=0.5174x + 4.5749	0.9902	87.795

Pemeriksaan aktivitas antioksidan ekstrak etanol limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) dilakukan dengan mengukur masing-masing konsentrasi larutan terhadap radikal bebas DPPH dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Visibel pada panjang gelombang maksimum DPPH yang telah ditentukan melalui optimasi adalah pada panjang gelombang 515 nm. Pengurangan aktivitas radikal bebas DPPH setelah diberi larutan ekstrak etanol limbah kulit buah apel dapat dilihat dari warna yang dihasilkan. Semakin tinggi konsentrasi larutan ekstrak etanol limbah kulit buah apel yang diberikan, maka warna ungu yang dimiliki DPPH akan semakin berkurang hingga dapat berubah warna menjadi kuning. Hal ini dapat menentukan aktivitas antioksidan yang terkandung dalam ekstrak etanol limbah kulit buah apel.

Pembandingan atau kontrol positif digunakan kuersetin standar (PT. Sigma-Aldrich). Kuersetin standar merupakan antioksidan alami yang memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat. Konsentrasi dari larutan kuersetin standar yang digunakan adalah 2 ppm, 4 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 30 ppm, pemilihan konsentrasi tersebut adalah berdasarkan *trial* atau percobaan yang telah dilakukan terlebih dahulu. Nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) kuersetin standar adalah sebesar 20.604  $\mu\text{g/mL}$  dengan klasifikasi antioksidan sangat kuat karena nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) kurang dari 50  $\mu\text{g/mL}$ . Nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) diperoleh dari perhitungan regresi linier yaitu dengan memasukkan nilai konsentrasi  $x$  dan persen peredaman sebagai  $y$ . Masukkan ke dalam persamaan  $y = a + bx$ , lalu faktor  $y$  diganti dengan nilai 50 sehingga diperoleh nilai  $x$  yang menunjukkan nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ).

Konsentrasi pada larutan ekstrak etanol limbah kulit buah apel yang

digunakan adalah 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm, 60 ppm, pemilihan konsentrasi pada sampel juga berdasarkan *trial* atau percobaan yang telah dilakukan terlebih dahulu. Nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) adalah sebesar 87.795  $\mu\text{g/mL}$  dengan klasifikasi antioksidan kuat karena nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) berada diantara 50-100  $\mu\text{g/mL}$ <sup>6</sup>.

Perbedaan pada nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) antara kuersetin standar dan ekstrak etanol limbah kulit buah apel dikarenakan pada ekstrak etanol limbah kulit buah apel terdapat pengotor atau zat-zat lain yang dapat mengganggu konsentrasi peredaman terhadap radikal bebas DPPH karena ekstrak etanol limbah kulit buah apel dibuat melalui proses maserasi dimana tidak hanya zat-zat atau bahan kimia yang berkhasiat sebagai antioksidan saja yang larut dalam cairan penyari, akan tetapi banyak zat-zat atau bahan kimia lain yang tidak berkhasiat sebagai antioksidan yang ikut larut dalam cairan penyari yang dapat mengganggu konsentrasi peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Perbedaan nilai  $IC_{50}$  antara kontrol positif kuersetin standar dan ekstrak etanol limbah kulit buah apel dapat diakibatkan oleh kemampuan masing-masing senyawa dalam memberikan elektron kepada DPPH, semakin banyak elektron yang diberikan kepada DPPH akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansinya yang berarti meningkatnya persen inhibisi dan menurunnya nilai  $IC_{50}$ <sup>(10)</sup>.

Antioksidan diharapkan memiliki ciri-ciri sebagai berikut, aman dalam penggunaan, tidak memberikan flavor, odor, warna pada produk dan efektif pada konsentrasi rendah, serta tahan terhadap proses pengolahan produk dan memiliki kemampuan antioksidan yang baik, tersedia dengan harga murah<sup>(11)</sup>. Limbah Kulit buah apel merupakan limbah yang memenuhi sifat sifat antioksidan tersebut diatas dimana kulit

buah apel aman dalam penggunaan tidak memberikan flavor, odor, warna pada produk dan efektif pada konsentrasi rendah yang dibuktikan dari hasil  $IC_{50}$  yang rendah.

#### SIMPULAN

Dari hasil penelitian uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol limbah kulit buah apel yang berdasarkan pada nilai *Inhibition Concentration* 50% ( $IC_{50}$ ) yaitu sebesar 87.795 ppm dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol limbah kulit buah apel (*Malus domestica* Borkh.) memiliki aktivitas antioksidan terhadap radikal bebas DPPH (2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazil) dengan klasifikasi kuat Sifat-sifat Antioksidan (Widjaja, S; 1659-1672)

#### DAFTAR PUSTAKA

1. Subagyo, P., dan Achmad Z., 2010. *Pemungutan Pektin Dari Kulit dan Ampas Apel Secara Ekstraksi*. Yogyakarta : Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Yogyakarta.
2. He, Xiangjiu and Hai, Liu, R. 2005. *Fitokimia Kulit Apel : Isolasi, Eludasi Struktur, Antiproliferasi Dan Aktivitas Antioksidan*. New York : Department Of Food Science And Institute Of Comparative, Cornell University.
3. Nurcahyati, Erna. 2014. *Khasiat & Manfaat Dahsyatnya Kulit Apel Untuk Kesehatan Dan Penyembuhan*. Jakarta : Jendela Sehat.
4. Wasim, Farhan, A. 2010. *Isolasi & Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dendang Gendis ( Clinacanthus nutans)*. Yogyakarta : Program Studi Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
5. Anonim. 1995. *Materia Medika Indonesia Jilid VI*. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
6. Harahap, P., Purnamasari. 2013. *Pembuatan Dan Uji Aktivitas Antioksidan Nanopartikel Emas Menggunakan Gom Arab Sebagai Penstabil*. Depok : Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia.
7. Pertiwi, R Dyah, 2014, *Pembuatan, Karakterisasi, Uji Invitro Dan In vivo Nano Partikel Emas Berbasis Konjugat Gom Arab-Vinkristin (Aunp-Ga-Vcr) Sebagai Obat Terapi Kanker Terarah*, Fakultas Frmasi, Universitas Indonesia, Jakarta
8. Voight, R. 1984. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V*. Yogyakarta : Media Presindo.
9. Nilza. 2009. *Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etanol Dan Kloroform Ekstrak Etanol Rimpang Temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.) Terhadap Radikal Bebas DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazil) Secara Spektrofotometri*. Jakarta : Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Muhammadiyah Prof. Dr. Hamka.
10. Ikhlas, Nur. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Herba Kemangi (Ocimum americanum Linn) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil)*. Jakarta : Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah
11. Widjaja, S. *Antioksidan : Pertahanan Tubuh Terhadap Efek Oksidan Dan Radikal Bebas*. Jakarta : Fakultas Kedokteran, USAKTI.