

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Radikal bebas banyak dijumpai pada lingkungan, asap rokok, asap kendaraan, obat, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain (Droge, 2002). Tubuh manusia dilengkapi oleh seperangkat sistem pertahanan untuk menangkal serangan radikal bebas atau oksidan sehingga dapat membatasi kerusakan yang diakibatkan oleh radikal bebas (Nabet, 1996).

Senyawa antioksidan dapat berupa senyawa alam maupun senyawa sintetik. Antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Senyawa fenol sintesis seperti Butil hidroksianisol (BHA) dan Butil hidroksitoluen (BHT) bukan antioksidan yang baik, sebab pada pemaparan yang lama dapat menyebabkan efek negatif terhadap kesehatan serta meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Ito *et al.*, 1986).

Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari (Pratt, 1992). Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional (Nakatani, 1992).

Konsentrasi tertinggi flavonoid dalam buah-buahan dan sayuran cenderung ditemukan pada daun, kulit dan biji, tetapi setiap metode pengolahan hampir selalu membuang bagian-bagian ini (Clayton, 2008). Kulit lidah buaya saat ini hanya menjadi limbah, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menjadikan

kulit lidah buaya lebih bermanfaat bagi masyarakat dan meningkatkan pemberdayaan kekayaan sumber alam Indonesia.

Ekstrak metanol daun lidah buaya merupakan sumber antioksidan yang baik dengan total fenolik 95.20 mg/g dan total flavonoid 88.59 mg/g (Vastrad *et al.*, 2015). Penelitian Vastrad *et al.*, 2015 juga menunjukkan bahwa kandungan flavonoid ekstrak metanol daun lidah buaya lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol daun lidah buaya. Kandungan flavonoid ekstrak metanol daun lidah buaya yaitu sebesar 88.59 mg/g, sedangkan kandungan flavonoid ekstrak etanol daun lidah buaya hanya sebesar 76.50mg/g.

Ekstrak etanol (80%) kulit lidah buaya memiliki kandungan antioksidan yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak kental gel lidah buaya dan ekstrak etanol (80%) gel lidah buaya. Kandungan fenolik dalam ekstrak etanol (80%) kulit lidah buaya sebesar 62.37 ± 1.34 mg/kg dan kandungan flavonoid ekstrak etanol (80%) kulit lidah buaya sebesar 20.83 ± 0.77 g/kg (Moniruzzaman *et al.*, 2012).

Metanol merupakan pelarut yang lebih baik dibandingkan dengan etanol dalam menarik senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian Sultana *et al.*, 2009 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun lidah buaya mampu menghambat aktivitas DPPH sebesar $72.9 \pm 1.5\%$, sedangkan ekstrak etanol daun lidah buaya hanya sebesar $68.0 \pm 1.3\%$.

Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar. Metanol dapat menarik

alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman (Thompson, 1985) serta menarik golongan senyawa fenolik secara optimum (Ghazemsadeh *et al.*, 2011).

Pelarut yang dapat melarutkan aglikon flavonoid adalah etil asetat dan aseton. Etil asetat merupakan pelarut dengan toksisitas rendah yang bersifat semi polar sehingga di harapkan dapat menarik senyawa yang bersifat semi polar dari aglikon flavonoid (Harborne, 1987). Jenis aglikon flavonoid yang bersifat semi polar adalah flavonon dan flavonol (Markham, 1988).

Senyawa flavonoid memiliki sifat sebagai antioksidan karena mampu menangkal radikal bebas DPPH. Larutan radikal bebas DPPH berwarna ungu, karena memiliki atom nitrogen yang tidak berpasangan. Reaksi DPPH dengan atom hidrogen yang terdapat pada flavonoid dapat membuat larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang berwarna ungu menjadi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) berwarna kuning (Molyneux, 2004).

Berdasarkan latar belakang di atas maka dilakukan penelitian uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) menggunakan metode DPPH. Penggunaan DPPH dipilih karena sederhana, mudah, cepat, dan peka serta hanya memerlukan sedikit sampel (Blois, 1958). Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid pada kulit lidah buaya dapat dideteksi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang akan menunjukkan warna kuning setelah diuapi dengan amoniak (Markham, 1988).

B. Rumusan Masalah

1. Apakah fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang dinyatakan dengan IC_{50} ?

2. Apakah ada senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.)?

C. Tujuan Penelitian

1. Mengetahui aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) yang ditunjukkan nilai IC₅₀ dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).
2. Mengetahui adanya senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

D. Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menambah bukti ilmiah pemanfaatan kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) yang memiliki aktivitas antioksidan agar penyakit degeneratif yang disebabkan radikal bebas dapat terkendali. Hasil penelitian juga diharapkan sebagai bukti ilmiah pemanfaatan kulit lidah buaya sehingga kulit lidah buaya tidak hanya sebagai limbah tetapi juga untuk peningkatan kesehatan dan upaya peningkatan pendayagunaan kekayaan sumber alam Indonesia.

E. Tinjauan Pustaka

1. Lidah buaya (*Aloe vera* L.)

a. Klasifikasi

Kedudukan Lidah Buaya (*Aloe vera* L.) dalam sistematika tanaman (taksonomi) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisio : Magnoliophyta / Spermatophyta
Sub Divisio : Magnoliophyta / Angiospermae
Class : Liliopsida / Dicotyledoneae
Ordo : Liliales
Family : Asphodelaceae
Genus : *Aloe*
Species : *Aloe vera* L. (Backer and Brink, 1968).

b. Morfologi

Lidah buaya merupakan habitus semak, tinggi 30-50 cm. Batang lidah buaya berbentuk bulat, tidak berkayu dan berwarna putih. Daun lidah buaya tunggal, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, panjang 30-50 cm, lebar 3-5 cm, berdaging tebal dan bergetah kuning atau hijau. Lidah buaya memiliki bunga majemuk, bentuk malai, terdapat di ujung batang, daun pelindung panjang 8-15 mm, benang sari ada enam, putik menyembul keluar atau melekat pada pangkal kepala sari, tangkai putik bentuk benang, kepala putik kecil, hiasan bunga panjang 2,5-3,5 cm, tabung pendek, ujung tajuk melebar dan berwarna jingga atau merah. Buah lidah buaya berbentuk kotak, panjang 14-22 cm, berkatup dan berwarna hijau keputih-putihan. Biji kecil dan berwarna hitam. Lidah buaya memiliki akar serabut dan berwarna kuning (BPOM RI, 2008).

Struktur lidah buaya terdiri dari : kulit lidah buaya, getah yang mengandung antrakuinon, gel daging beserta lapisan mucilage. Kulit lidah

buaya merupakan lapisan terluar yang berwarna hijau dan terdiri dari 15-18 lapisan sel yang memiliki sifat fisik protektif dan terdapat kloroplas. Lapisan kulit pada lidah buaya mengandung seluruh bahan fotosintesis dan merupakan tempat terjadinya sintesis dari seluruh bahan nutrisi alami yang ada dalam lidah buaya seperti karbohidrat, lemak, protein dan vitamin (Barcroft, 2003). Gambar tanaman dan kulit lidah buaya dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 1. Tanaman dan Kulit Lidah Buaya (BPOM RI, 2008; Assunta, 2006)

c. Kandungan kimia

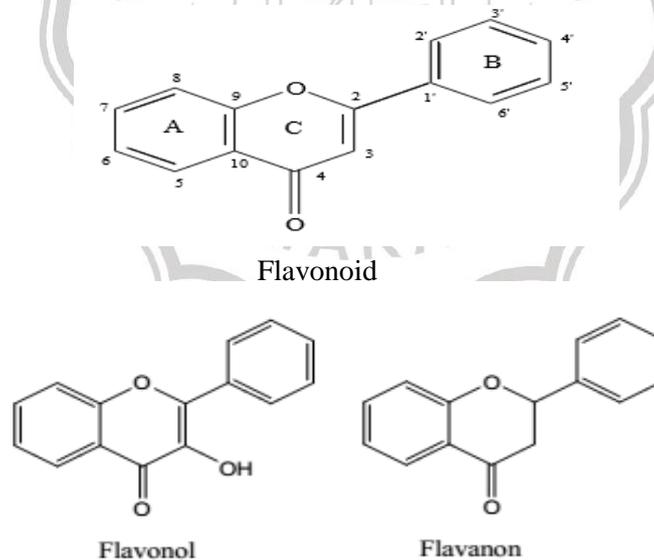
Lidah buaya (*Aloe vera* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, dan tanin (Vastrad *et al.*, 2015). Senyawa flavonoid adalah senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 atom karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Markham, 1988).

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol yang terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk akar, daun, kayu, bunga, buah, dan biji (Harborne, 1987). Flavonoid adalah senyawa polar yang larut dalam pelarut

polar seperti etanol, metanol, butanol, air, dimetilsulfoksida (DMSO) dan dimetilformamida (DMF) (Markham, 1988). Aglikon flavonoid yang bersifat semi polar seperti flavonol dan flavanon larut dalam pelarut semi polar seperti etil asetat (Markham, 1988).

Senyawa flavonoid memiliki sifat sebagai antioksidan karena mampu menangkal radikal bebas DPPH. Larutan radikal bebas DPPH berwarna ungu, karena memiliki atom nitrogen yang tidak berpasangan. Reaksi DPPH dengan atom hidrogen yang terdapat pada flavonoid dapat membuat larutan DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yang berwarna ungu menjadi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazin) berwarna kuning (Molyneux, 2004).

Struktur flavonoid, flavonol dan flavanon dapat dilihat pada Gambar 2 berikut ini :



Gambar 2. Struktur Flavonoid, Flavonol dan Flavanon (Markham, 1988)

d. Khasiat Tanaman

Lidah buaya telah digunakan sebagai agen antimikroba (Habeeb *et al.*, 2007), antiinflamasi (Vazquez *et al.*, 1996) dan antidiabetik (Rajasekaran *et*

al., 2006). Lidah buaya juga memiliki aktivitas hepatoprotektor (Chandan *et al.*, 2007). Selain itu, lidah buaya mampu mengurangi penyerapan air pada usus dan membantu memperlancar buang air besar, sehingga lidah buaya banyak digunakan sebagai laksatif (Ashafa *et al.*, 2011).

Lidah buaya mengandung beberapa mineral seperti kalsium, magnesium, kalium, sodium, besi, zinc dan kromium. Beberapa vitamin dan mineral tersebut dapat berfungsi sebagai pembentuk antioksidan alami, seperti fenol, flavonoid, vitamin C, vitamin E, vitamin A dan magnesium. Antioksidan ini berguna untuk mencegah penuaan dini, serangan jantung dan berbagai penyakit degeneratif (Astawan dan Kasih, 2008).

2. Radikal Bebas

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Clarkson and Thompson, 2000). Kebanyakan radikal bebas bereaksi secara cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan, sehingga radikal bebas normalnya berdiri sendiri hanya dalam periode waktu yang singkat sebelum menyatu dengan atom lain. Simbol untuk radikal bebas adalah sebuah titik yang berada di dekat simbol atom ($R\bullet$). ROS (*Reactive Oxygen Species*) adalah senyawa pengoksidasi turunan oksigen yang bersifat sangat reaktif yang terdiri atas kelompok radikal bebas dan kelompok nonradikal. Kelompok radikal bebas antara lain *superoxide anion* ($O_2\bullet^-$), *hydroxyl radicals* ($OH\bullet$) dan *peroxyl radicals* ($RO_2\bullet$). Yang nonradikal misalnya *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *organic peroxides* ($ROOH$) (Halliwell and Whiteman, 2004). Radikal bebas dalam tubuh

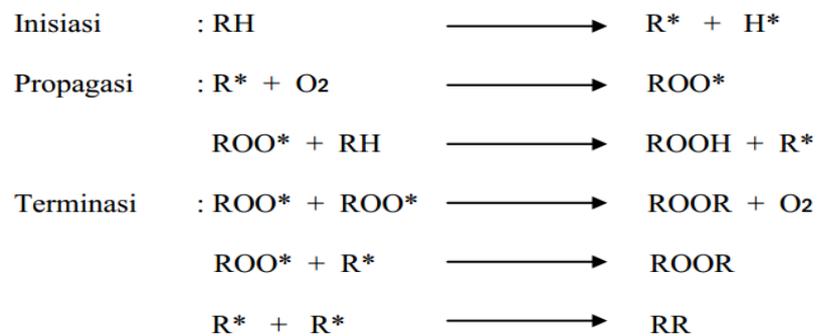
dapat terbentuk melalui proses metabolisme sel normal, peradangan, kekurangan gizi dan akibat respon terhadap pengaruh dari luar tubuh seperti asap rokok, polusi lingkungan, ultraviolet (UV) dan lain sebagainya (Winarsi, 2007).

Radikal bebas dapat mengoksidasi asam nukleat, protein, lemak, bahkan DNA sel dan menginisiasi timbulnya penyakit degeneratif (Rohmatussolihat, 2009). Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab berbagai macam penyakit degeneratif misalnya kanker, atherosklerosis dan neurodegeneratif (Tapan, 2005).

Radikal bebas yang berlebihan atau produksi antioksidan yang tidak mencukupi dapat menyebabkan kerusakan dari sel-sel jaringan dan enzim di dalam tubuh. Kerusakan jaringan terjadi akibat gangguan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas asam lemak atau yang biasa dikenal sebagai peroksidasi lipid. Selain peroksidasi lipid, kerusakan sel juga disebabkan oleh peroksidasi protein dan kerusakan DNA (Arief, 2007).

Oksidasi lemak terdiri dari tiga tahap utama, yaitu inisiasi, propagasi dan terminasi. Tahap inisiasi terjadi pembentukan radikal asam lemak, yaitu senyawa turunan asam lemak yang bersifat tidak stabil dan sangat reaktif akibat dari hilangnya satu atom hidrogen. Tahap selanjutnya, yaitu propagasi, radikal asam lemak akan bereaksi dengan oksigen membentuk radikal peroksida. Radikal peroksida lebih lanjut akan menyerang asam lemak menghasilkan hidroperoksida dan radikal asam lemak baru. Tahap terminasi terjadi penggabungan radikal-radikal bebas membentuk produk non radikal yang stabil (Shahidi and

Wanasundara, 2002). Gambar mekanisme oksidasi lemak dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 3. Mekanisme Oksidasi Lemak

3. Antioksidan

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat menghambat kerja radikal bebas dengan cara menyerahkan satu atau lebih elektronnya kepada radikal bebas sehingga menjadi bentuk molekul yang normal kembali dan menghentikan berbagai kerusakan yang dapat ditimbulkan. Penggunaan senyawa antioksidan berkembang seiring dengan semakin bertambahnya pengetahuan tentang aktivitas radikal bebas terhadap beberapa penyakit degeneratif seperti penyakit jantung dan kanker (Pokorny *et al.*, 2001).

Terdapat tiga jenis antioksidan yaitu, antioksidan yang dibuat oleh tubuh kita sendiri yang berupa enzim-enzim, antioksidan alami yang diperoleh dari hewan dan tumbuhan dan antioksidan sintetik yang dibuat dari bahan-bahan kimia (Kumalaningsih, 2006).

Antioksidan sintetik adalah antioksidan yang diperoleh dari hasil sintesis reaksi kimia. Senyawa fenol sintetis seperti Butil hidroksianisol (BHA) dan Butil hidroksitoluen (BHT) bukan antioksidan yang baik, sebab pada pemaparan yang

lama dapat menyebabkan efek negatif terhadap kesehatan serta meningkatkan terjadinya karsinogenesis (Ito *et al.*, 1986).

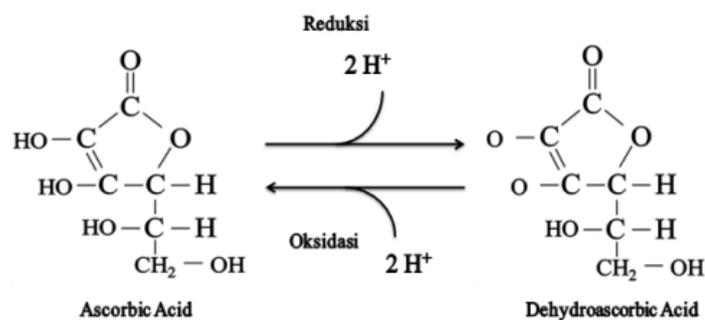
Senyawa antioksidan yang diisolasi dari sumber alami adalah yang berasal dari tumbuhan yaitu tokoferol, vitamin C, betakaroten, flavonoid dan senyawa fenolik. Isolasi antioksidan alami telah dilakukan dari tumbuhan yang dapat dimakan, tetapi tidak selalu dari bagian yang dapat dimakan. Antioksidan alami tersebar di beberapa bagian tanaman, seperti pada kayu, kulit kayu, akar, daun, buah, bunga, biji dan serbuk sari (Pratt, 1992). Senyawa antioksidan alami tumbuhan umumnya adalah senyawa fenolik atau polifenolik yang dapat berupa golongan flavonoid, turunan asam sinamat, kumarin, tokoferol dan asam-asam organik polifungsional. Golongan flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan meliputi flavon, flavanon, isoflavon, kateksin, flavonol dan kalkon. Sementara turunan asam sinamat meliputi asam kafeat, asam ferulat, asam klorogenat dan lain-lain (Nakatani, 1992).

4. Vitamin C

Vitamin C adalah nutrisi dan vitamin yang larut dalam air dan penting untuk kehidupan serta untuk menjaga kesehatan. Vitamin ini juga dikenal dengan nama kimia dari bentuk utamanya yaitu asam askorbat. Vitamin C dikenal sebagai antioksidan terlarut air, vitamin C juga secara efektif mengambil formasi ROS (*Reactive Oxygen Species*) dan radikal bebas (Frei, 1994).

Vitamin C dapat langsung bereaksi dengan anion superoksida, radikal hidroksil, oksigen singlet dan lipid peroksida. Sebagai reduktor asam askorbat akan mendonorkan satu elektron membentuk semi dehidroaskorbat yang tidak

bersifat reaktif dan selanjutnya mengalami reaksi disproportionasi membentuk dehidroaskorbat yang bersifat tidak stabil. Dehidroaskorbat akan terdegradasi membentuk asam oksalat dan asam treonat. Oleh karena kemampuan vitamin C sebagai penghambat radikal bebas, maka peranannya sangat penting dalam menjaga integritas membran sel (Suhartono *et al.*, 2007). Reaksi reduksi dan oksidasi asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 4 sebagai berikut :



Gambar 4. Reaksi Reduksi dan Oksidasi Asam Askorbat (Szent-Györgyi, 1937)

5. Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan suatu bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Depkes RI, 2000). Sebelum memulai ekstraksi, dilakukan persiapan bahan baku yang mencakup pengeringan bahan sampai kadar air tertentu dan penggilingan bahan untuk mempermudah proses ekstraksi. Selain itu, tingkat kemudahan ekstraksi bahan kering masih ditentukan oleh ukuran partikel bahan. Bahan yang akan diekstrak sebaiknya berukuran seragam untuk mempermudah kontak antar bahan dengan pelarut (Purseglove *et al.*, 1981).

Pelarut yang biasa digunakan adalah air, eter atau campuran etanol dan air. Ekstraksi dengan menggunakan pelarut dibedakan menjadi dua macam, yaitu

metode dingin dan metode panas. Metode dingin terdiri dari maserasi dan perkolasi, sedangkan metode panas terdiri dari refluks, soxhletasi, digesti, infus dan dekok. Metode ekstraksi biasanya dipilih berdasarkan sifat dari bahan mentah obat dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi serta kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau bahkan mendekati sempurna dari bahan obat. Sifat dari suatu bahan mentah obat merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi (Ansel, 1989).

Maserasi adalah proses dimana suatu bahan obat yang sudah halus direndam dalam cairan penyari sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan melarut (Depkes RI, 2000). Bahan yang akan diekstraksi ditempatkan dalam bejana bermulut lebar, bersama cairan penyari yang telah ditetapkan, bejana ditutup rapat dan isinya dikocok berulang-ulang sehingga cairan penyari akan menembus dinding sel kemudian masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga melarutkan zat aktif. Ampasnya dapat dipisah dengan cara disaring dengan penambahan cairan penyari sampai ampas bebas dari ekstrak. Maserasi umumnya dilakukan pada suhu 15-20°C selama tiga hari sampai bahan-bahan yang diinginkan melarut (Ansel, 1989).

Salah satu pelarut yang dapat digunakan untuk ekstraksi adalah metanol. Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar dan nonpolar. Metanol dapat menarik alkaloid, steroid, saponin, dan flavonoid dari tanaman (Thompson, 1985) serta menarik golongan senyawa fenolik secara optimum (Ghazemsadeh *et al.*, 2011).

6. Partisi Cair-Cair

Teknik yang biasa digunakan untuk tahap fraksinasi adalah partisi. Dasar dari pemisahan cara partisi adalah pemisahan dua senyawa atau lebih berdasarkan perbedaan kelarutan dengan syarat dua pelarut mempunyai sifat tidak saling bercampur (Sudjadi, 1986). Partisi cair-cair adalah proses pemisahan zat terlarut didalam dua macam zat pelarut yang tidak saling bercampur antara pelarut organik dan pelarut air. Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan metode partisi cair-cair menggunakan pelarut semi polar yaitu etil asetat. Etil asetat adalah senyawa organik yang merupakan ester dari etanol dan asam asetat yang berwujud cairan tak berwarna dan memiliki aroma khas (Depkes RI, 1979). Etil asetat dapat melarutkan senyawa yang bersifat semi polar dari aglikon flavonoid (Harborne, 1987). Jenis aglikon flavonoid yang bersifat semi polar adalah flavonon dan flavonol (Markham, 1988).

7. Spektrofotometri

Spektrofotometri adalah suatu metode analisis yang didasarkan pada pengukuran serapan monokromatis oleh larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik dengan menggunakan monokromator prisma atau kisi difraksi dengan detektor *fototube* (Khopkar, 1990).

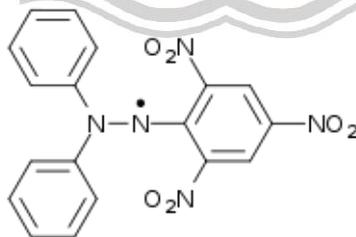
Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 515-520 nm (Molyneux, 2004). Penelitian Aji (2014) menunjukkan penentuan aktivitas antioksidan ekstrak metanol daging daun lidah buaya dengan metode DPPH menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,8 nm.

Prahesti dkk., 2015 melakukan penelitian aktivitas antioksidan ekstrak metanol pada daging lidah buaya dengan metode DPPH dan pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 515,5 nm.

Penentuan total flavonoid ekstrak etanol (80%) kulit lidah buaya yang dilakukan Moniruzzaman *et al.*, 2012 menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 510 nm dan katekin digunakan sebagai kontrol, serta pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada panjang gelombang 517 nm.

8. Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

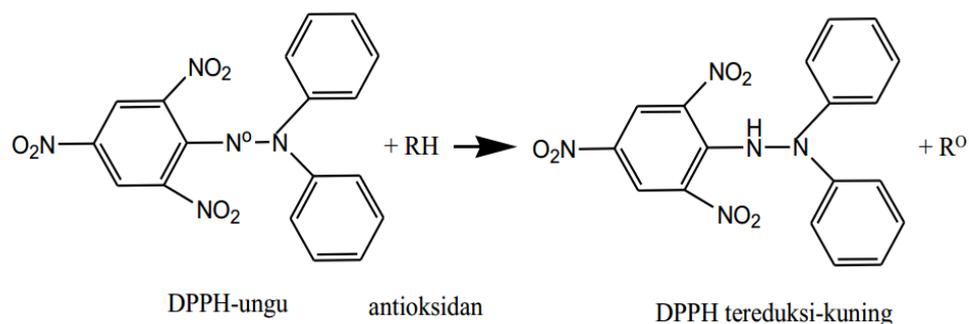
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) adalah suatu radikal sintetik yang stabil, larut dalam pelarut polar seperti metanol dan etanol, serta dapat diukur intensitasnya pada panjang gelombang 515-520 nm. DPPH dapat bereaksi dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen yang berguna untuk pengujian aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak (Molyneux, 2004). Struktur kimia DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) dapat dilihat pada Gambar 5 sebagai berikut:



Gambar 5. Struktur Kimia DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

Prinsip reaksi dari metode ini adalah penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH. Mekanisme yang terjadi adalah reaksi penangkapan hidrogen dari antioksidan oleh radikal bebas DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)

warna ungu dan diubah menjadi DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazin) warna kuning. Pemudaran warna akan mengakibatkan penurunan nilai absorbansi sinar tampak dari spektrofotometer. Semakin pudarnya warna DPPH setelah direaksikan dengan antioksidan menunjukkan kapasitas antioksidan yang semakin besar pula (Benabadji *et al.*, 2004). Reaksi radikal bebas DPPH dengan senyawa antioksidan dapat dilihat pada Gambar 6 sebagai berikut:



Gambar 6. Reaksi Radikal Bebas DPPH dengan Senyawa Antioksidan (Molyneux, 2004)

9. *Inhibition Concentration*₅₀ (IC₅₀)

Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC₅₀ atau *Inhibitor Concentration*₅₀. Nilai IC₅₀ didefinisikan sebagai konsentrasi larutan sampel yang dapat menyebabkan penurunan aktivitas DPPH sebanyak 50% yang dilihat dari pengurangan intensitas warna ungu. Harga IC₅₀ berbanding terbalik dengan kemampuan zat atau senyawa yang bersifat sebagai antioksidan. Semakin kecil nilai IC₅₀ berarti semakin kuat daya antioksidannya (Molyneux, 2004).

Spesifitas daya antioksidan menurut Blois (1958) adalah:

Sangat kuat	:	IC ₅₀ < 50 ppm
Kuat	:	50 ppm > IC ₅₀ < 100 ppm
Sedang	:	100 ppm > IC ₅₀ < 150 ppm
Lemah	:	150 ppm > IC ₅₀ < 200 ppm

Sangat lemah : $IC_{50} > 200$ ppm

10. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi digunakan untuk memisahkan komponen yang terkandung dalam ekstrak dimana komponen tersebut terdistribusi di antara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode yang mudah, cepat, tidak mahal dan memiliki kelebihan dibanding kromatografi kertas yang memiliki keterbatasan dalam penggunaan fase geraknya (Striegel dan Hill, 1996).

Banyak bercak flavonoid yang tidak terlihat pada lempeng KLT, maka untuk mendeteksi bercak pada kromatogram perlu dilihat menggunakan sinar UV. Kromatogram yang sudah kering perlu diuapi menggunakan amoniak, uap amoniak ini akan meningkatkan kepekaan deteksi dan menghasilkan perubahan warna pada bercak flavonoid (Markham, 1988). Senyawa flavonoid pada suasana basa akan berubah warna menjadi kuning terang atau jingga, sedangkan pada larutan asam maupun netral tidak berwarna. Perubahan warna ini disebabkan oleh pembentukan garam dan terbentuknya struktur kuinoid pada cincin B flavonoid (Robinson, 1995).

Pengamatan pada KLT dilakukan dengan cara melihat nilai R_f (*Retardation factor*) dari solut. Nilai R_f didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh solut dibagi jarak yang ditempuh fase gerak. Rumusnya adalah sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa terlarut}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}}$$

(Gandjar dan Rohman, 2009).

Nilai R_f dinyatakan hingga angka 1,0. Nilai R_f yang baik yang menunjukkan pemisahan yang cukup baik adalah berkisar antara 0,2-0,8 (Gandjar dan Rohman, 2009).

F. Landasan Teori

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang mempunyai elektron yang tidak berpasangan pada orbital terluarnya dan dapat berdiri sendiri (Clarkson and Thompson, 2000). Radikal bebas banyak dijumpai pada lingkungan, asap rokok, asap kendaraan, obat, makanan dalam kemasan, bahan aditif, dan lain-lain (Droge, 2002). Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab berbagai macam penyakit degeneratif misalnya kanker, atherosklerosis dan neurodegeneratif (Tapan, 2005).

Konsentrasi tertinggi flavonoid dalam buah-buahan dan sayuran cenderung ditemukan pada daun, kulit dan biji, tetapi setiap metode pengolahan hampir selalu membuang bagian-bagian ini (Clayton, 2008). Lidah buaya (*Aloe vera* L.) mengandung alkaloid, flavonoid, fenol, dan tanin (Vastrad *et al.*, 2015). Salah satu senyawa flavonoid yaitu kuersetin merupakan antioksidan yang sangat kuat, dilihat dari nilai IC_{50} sebesar 3.17 $\mu\text{g/mL}$ diuji menggunakan metode DPPH (Ahmad *et al.*, 2017).

Penelitian Vastrad *et al.*, 2015 menunjukkan kandungan flavonoid ekstrak metanol daun lidah buaya yaitu sebesar 88.59 mg/g, sedangkan kandungan flavonoid ekstrak etanol daun lidah buaya hanya sebesar 76.50 mg/g.

Penelitian yang dilakukan oleh Botes *et al.*, 2008 pada ekstrak etanol (95%) gel daun lidah buaya menunjukkan adanya aktivitas antioksidan dengan kandungan flavonoid sebesar 20.2 ± 0.5 mg/100g. Metanol merupakan pelarut yang lebih baik dibandingkan dengan etanol dalam menarik senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan. Penelitian Sultana *et al.*, 2009 menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun lidah buaya mampu menghambat aktivitas DPPH sebesar $72.9 \pm 1.5\%$, sedangkan ekstrak etanol daun lidah buaya hanya sebesar $68.0 \pm 1.3\%$.

Kandungan fenolik dan flavonoid dalam ekstrak etanol (80%) kulit lidah buaya yang dilakukan oleh Moniruzzaman *et al.*, 2012 yaitu sebesar 62.37 ± 1.34 mg/kg dan 20.83 ± 0.77 g/kg. Penelitian yang dilakukan Aji, 2014 pada ekstrak metanol daging daun lidah buaya menunjukkan bahwa pada konsentrasi 200 ppm mampu menghambat DPPH sebesar 38.88%. Prahesti dkk., 2015 melakukan penelitian ekstrak metanol *Aloe vera* Linn menggunakan empat fraksinasi yaitu fraksi *n*-heksana, diklorometana, etil asetat dan air. Uji fenolat hanya positif pada ekstrak metanol, fraksi etil asetat dan fraksi air dengan hasil sebesar 12.47 mg/g, 0.89 mg/g dan 16.5 mg/g. Aktivitas antioksidan ditunjukkan dengan nilai IC_{50} dari masing-masing yaitu 519.23 mg/L, 131.36 mg/L dan 433mg/L.

Pelarut yang dapat melarutkan aglikon flavonoid seperti etil asetat dan aseton (Harborne, 1987). Jenis aglikon flavonoid yang bersifat semi polar adalah flavonon dan flavonol. Untuk mengetahui adanya senyawa flavonoid dapat dideteksi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang akan menunjukkan warna kuning setelah diuapi dengan amoniak (Markham, 1988).

G. Hipotesis

Berdasarkan landasan teori, hipotesis yang diajukan adalah :

1. Fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) memiliki aktivitas antioksidan yang ditunjukkan nilai IC_{50} dengan metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil).
2. Fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit lidah buaya (*Aloe vera* L.) mengandung senyawa flavonoid dengan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis).

