

PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL DAN UJI DAYA ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN UNGU (*Graptophyllum pictum* L.) Griff)

Haeria

Jurusan Farmasi FIK UIN Alauddin Makassar

Abstract

A study concerning determination of total flavanoid content, and antioxidant activity of ethanolic extract daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). The purpose of this study was to determine the levels of total flavonoids and reduction power test of ethanolic extract daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). Extraction of chemical constituents from the daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) by maceration method using ethanol 70%. To determine the levels of flavonoids and reduction power of the extract samples, then analyzed using a spectrophotometer UV-Vis compound. The result showed levels of total flavonoids purple leaf (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) from a concentration of 2%, 3%, 4%, 5% and amounted to 6,293 mg/100 g, 7,856 mg/100 g, 8,335 mg/100 g and 8,852 g. In the determination of reducing power of ethanolic extract daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) had a reduced ability at 2%, 3%, 4%, 5% concentration and amounted to 5,65 mg/100 g, 14,73 mg/100 g, 17,70 mg/100 g and 21,60 mg/100 g. Reduction power ethanol extract of purple leaf was increase with increasing concentration, the higher concentration have more potent extract reduction capability.

Key Words: Flavonoid, *Graptophyllum pictum* (L.) Griff), Extract.

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan tumbuh-tumbuhan baik sebagai sumber makanan maupun obat-obatan untuk mengobati penyakit tertentu. Semakin beragamnya jenis penyakit, sebagian orang justru jenuh dengan obat-obat kimia. Sehingga muncullah kembali semangat untuk menggali obat-obat dari alam yang di

kenal dengan obat herbal. Berbagai penelitian dilakukan dan dikembangkan guna mengungkap kandungan dan rahasia yang ada pada berbagai tanaman. Tidak sedikit orang beralih pada tanaman dan mengkonsumsi sayur-sayuran sebagai media pengobatan atau media untuk menjaga kesehatan.

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol. Flavonoid sangat efektif untuk digunakan sebagai antioksidan (Astawan, 2008; 31). Ekstraksi flavonoid dari tumbuhan dapat dilakukan dengan menggunakan pelarut polar. Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dan air. Adanya gula yang terikat pada flavonoid cenderung menyebabkan flavonoid lebih mudah larut dalam air dan dengan demikian campuran pelarut di atas dengan air merupakan pelarut yang lebih baik untuk glikosida. Sebaliknya, aglikon yang kurang polar seperti isoflavon, flavanon, dan flavon serta flavonol yang termetoksilasi cenderung lebih mudah larut dalam pelarut seperti eter dan kloroform (Harborne, 1984; 47).

METODE KERJA

1. Alat

Batang pengaduk, blender (*Miyako*), chamber, corong, gelas kimia, inkubator (*Thermo Scientific*), kuvet, labu ukur 10 ml, 25 ml, 50 ml, dan 100 ml (*Iwaki pyrex*), magnetic stirrer (*Helth*), mikro pipet (*Bio-Rad*), neraca analitik (*Kern*), pH meter (*Schott*), pipa kapiler, pipet skala (*Iwaki pyrex*), pipet tetes, pipet volume (*Iwaki pyrex*), rak tabung reaksi,

rotavapor (*Heidolph*), sendok besi, sendok tanduk, sentrifugasi (*Thermo Scientific*), seperangkat alat maserasi, spektrofotometri UV-VIS (*Thermo Scientific*), dan tabung reaksi (*Iwaki pyrex*).

2. Bahan

Air Suling, aluminium foil, $AlCl_3$ 5%, daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff), daparphospat 0,2 M pH 6,6, etanol 70%, etanol p.a, etil asetat, $FeCl_3$ 0,1% dan 2%, $K_3Fe(CN)_6$ 1%, natrium asetat 1M, n-heksan, kuersetin p.a, silika gel, dan Trikloro asetat (TCA) 10%.

3. Prosedur

a. Penyiapan sampel

Sampel daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) diperoleh di Kabupaten Selayar, Sulawesi Selatan. Pengambilan sampel dilakukan pada pagi hari dengan cara mengambil daun kelima dari pucuk tanaman hingga pangkal. Daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) yang telah diambil, dicuci hingga bersih dengan air mengalir dan dikeringkan dalam ruangan tanpa terkena sinar matahari langsung, kemudian dipotong-potong kecil dan dihaluskan.

b. Ekstraksi Sampel

Simplisia daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) ditimbang sebanyak 500 g dimasukkan dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan n-heksan hingga simplisia terendam. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 3 x

24 jam di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung sambil sesekali diaduk. Selanjutnya disaring, dipisahkan antara ampas dan ekstraknya. Kemudian ampas diekstraksi kembali dengan etanol 70%. Hal ini dilakukan sebanyak 3 x 24 jam. Ekstrak etanol 70% yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan cairan penyaringnya sampai diperoleh ekstrak etanol kental.

c. Analisis Kualitatif

1) Pengujian Pendahuluan Flavonoid Secara KLT

Ekstrak etanol 70% dan perbandingan (kuersetin) yang telah dilarutkan dengan etanol 70%, ditotolkan bersama-sama pada lempeng kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silikagel dan fase gerak n-heksan : etil Asetat (1:3). Bercak kromatogram (noda) yang dihasilkan diamati dengan penampak noda sinar ultraviolet 254 nm dan 366 nm, sebelum dan setelah disemprot dengan AlCl_3 5%. Bercak dengan fluoresensi warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

2) Pengujian Pendahuluan Antioksidan

Kromatogram pada pengujian pendahuluan flavanoid disemprot dengan pereaksi semprot untuk uji antioksidan yaitu campuran yang baru dibuat dari larutan kalium ferisianida ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) 1% dan feriklorida (FeCl_3) 2% dengan perbandingan 1 : 1. Adanya bercak biru

menunjukkan adanya daya antioksidan (Stahl, 1985)

d. Analisis Kuantitatif

1) Penetapan Kadar Flavonoid Total

a) Preparasi Larutan Baku Kuersetin

Pertama kali dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang 0,0250 g kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 25 ml. Selanjutnya dibuat larutan baku kerja kuersetin dengan konsentrasi 100 ppm dengan pengenceran larutan induk 1000 ppm. Kemudian dibuat larutan standar kuersetin dari larutan baku kerja 100 ppm dengan deret konsentrasi 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, dan 40 ppm. Kemudian ditambahkan 0,10 ml aluminium klorida 10%, 0,10 ml natrium Asetat 1M dan 2,80 ml aqua steril. Campuran dikocok homogen lalu dibiarkan selama 30 menit. Kemudian siap dibaca.

b) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil salah satu konsentrasi larutan baku, diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

c) Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Kurva baku dibuat dengan menghubungkan konsentrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan

menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d) Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sampel ekstrak etanol daun ungu dilarutkan dengan etanol p.a (2%-5%), ditambahkan 0,10 ml aluminium klorida 10%, 0,10 ml natrium asetat 1M dan 2,80 ml aquadest. Campuran dikocok homogen lalu dibiarkan selama 30 menit. Kemudian diukur serapannya menggunakan spektrofotometer ultraviolet-visible (UV-VIS) pada panjang gelombang maksimum.

2) Uji Daya Reduksi

Penetapan daya mereduksi menggunakan metode Oyaizu yang dimodifikasi ((Katja, *et al*, 2009; Arini.dkk, 2003).

a) Preparasi Pembuatan Larutan baku kuersetin

Pertama kali dibuat larutan induk 1000 ppm dengan cara menimbang 0,0250 g kuersetin dan dilarutkan dengan etanol p.a hingga volume 25 ml. Kemudian dibuat larutan standar kuersetin dari larutan induk 1000 ppm dengan deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, 160 ppm. Kemudian masing-masing ditambahkan dengan 2,50 ml dapar fospat 0,2 M pH 6,6. Lalu ditambahkan 2,50 ml larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1,0 %. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50 °C. Setelah itu ditambahkan Trikloro asetat (TCA) 10% sebanyak 2,50 ml. Lalu di kocok sampai homogen, selanjutnya disentrifugasi pada

3000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 5,0 ml lapisan atas dari larutan tersebut ditambahkan dengan 5,0 ml aqua steril dan 1,0 ml besi (III) klorida 0,1%. Kemudian siap dibaca.

b) Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Diambil salah satu konsentrasi larutan standar, diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-800 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tinggi merupakan panjang gelombang maksimum.

c) Pembuatan kurva baku kuersetin

Kurva baku dibuat dengan menghubungkan konsenrasi larutan standar dengan hasil serapannya yang diperoleh dari pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum.

d) Pengukuran kemampuan mereduksi ekstrak etanol 70%

Dibuat larutan ekstrak etanol daun ungu dengan konsentrasi 2%, 3%, 4%, dan 5%. Kemudian masing-masing diambil 1,0 ml lalu ditambah dengan 2,50 ml dapar fospat 0,2 M pH 6,6. Kemudian ditambahkan 2,50 ml larutan $K_3Fe(CN)_6$ 1 %. Selanjutnya diinkubasi selama 20 menit pada suhu 50°C. Setelah itu ditambahkan Trikloro asetat (TCA) 10% sebanyak 2,50 ml. Lalu di kocok sampai homogen, selanjutnya disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit. Sebanyak 5,0 ml lapisan atas dari larutan tersebut

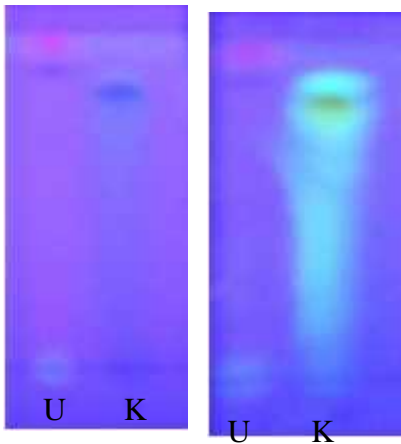
ditambahkan dengan 5,0 ml aqua steril dan 1,0 ml besi (III) klorida 0,1%. Kemudian masing-masing larutan tersebut

diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Analisis Kualitatif

a. Hasil Uji Pendahuluan Flavonoid dengan metode KLT



Gambar 1. Profil kromatogram senyawa flavonoid pada sampel ekstrak etanol 70% daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

Tabel 1. Hasil Analisis Kualitatif Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

No.	Sampel	Nilai Rf		Warna	
		UV 366 nm	AlCl ₃ 5%	UV 366 nm	AlCl ₃ 5%
1.	U	0,80	0,80	fluoresensi kuning	fluoresensi kuning
2.	K	0,80	0,80	fluoresensi kuning	fluoresensi kuning

Keterangan:

U : Sampel Daun Ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

K : Kuersetin (pembanding flavonoid)

A : Penampakan noda pada UV 366 nm

B : Penampakan noda pada UV 366 nm setelah penyemprotan AlCl₃ 5%

Fase gerak : N-heksan : Etil Asetat (1:3)

Fase diam : Silika gel GF254

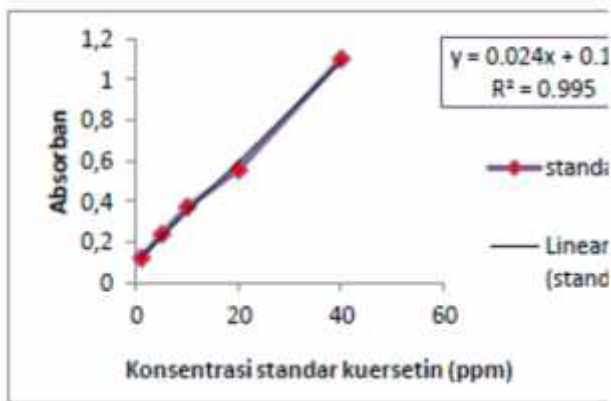
b. Hasil Uji Pendahuluan Antioksidan



Gambar 2: Foto Profil kromatogram adanya daya antioksidan pada sampel ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

2. Analisis Kuantitatif

a. Penentuan Serapan Larutan Standar Kuersetin Pada Panjang Gelombang 440 nm



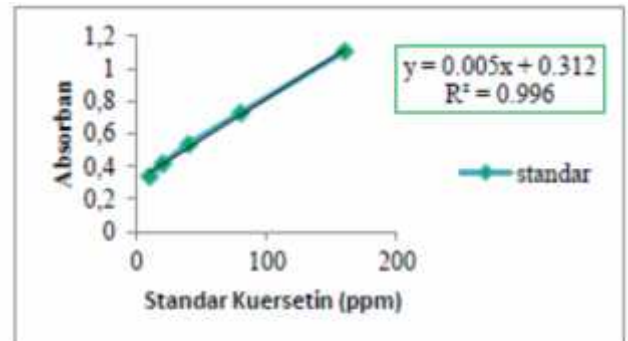
Gambar 3. Grafik perbandingan konsentrasi standar kadar flavonoid dengan nilai absorbansi

b. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun ungu

Tabel 2. Hasil Pengukuran serapan pada ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

Sampel (%)	Nilai Absorbansi	Kadar Flavonoid total (mg/100 g)
2	0,323	6,293
3	0,516	7,856
4	0,687	8,335
5	0,878	8,852

c. Uji daya reduksi



Gambar 4. Grafik perbandingan konsentrasi standar dengan nilai absorbansi

Tabel 3. Hasil Pengukuran serapan pada ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff)

Sampel (%)	Nilai Absorbansi	Daya Reduksi (mg/100g)
2	0,353	5,65
3	0,473	14,73
4	0,57	17,70
5	0,706	21,60

Pembahasan

Flavonoid merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil yang tak tersulih atau suatu gula, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol, metanol, butanol, aseton, dimetilsulfoksida, dimetilformamida, dan air (Harborne, 1984). Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, kemungkinan keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum

terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988). Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk pencegahan kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, antiinflamasi, mencegah keropos tulang, dan sebagai antibiotik (Harborne, 1984).

Sampel tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). Seluruh serbuk simplisia di maserasi dengan cairan penyari pertama yaitu pelarut n-heksan, sesudah dienanp tuangkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua yaitu etanol 70%. Metode remaserasi dipilih dalam penelitian ini karena sampel yang akan diteliti memiliki senyawa lemak. Sehingga penyarian awal dilakukan dengan menggunakan pelarut n-heksana. Hal ini dimaksudkan untuk menghilangkan kandungan kimia daun ungu yang bersifat non polar seperti lemak atau lilin. Penggunaan etanol 70% pada ekstraksi berikutnya dimaksudkan agar kandungan kimia daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) dapat tersari sempurna karena etanol 70% merupakan pelarut polar golongan alkohol yang mampu menyari sebagian besar senyawa organik yang ada pada sampel, mudah menguap sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak.

Untuk analisa kualitatif digunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Kromatografi Lapis Tipis adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Prinsipnya atas dasar perbedaan adsorpsi atau partisi oleh fase diam di bawah gerakan pelarut pengembang.

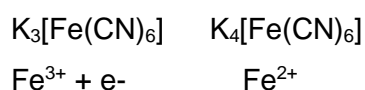
Kuersetin dipilih sebagai standar karena termasuk senyawa flavonol yaitu flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida, dan peroksil) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi, karena dapat menghasilkan radikal fenoksil yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Sri, 2008).

Pada penelitian ini kandungan flavonoid total ditentukan berdasarkan metode kalorimetri (Chang, *et al*), dimana prinsip dari metode kalorimetri ini adalah $AlCl_3$ membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keto, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu $AlCl_3$ juga membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid (Katja, *et al*, 2009) sehingga akan mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 440 nm.

Pengujian daya antioksidan dengan metode kemampuan mereduksi ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) dengan metode Oyaizu (Katja, *et al*, 2009), dilakukan untuk

membandingkan kemampuan mereduksi dari ekstrak etanol daun ungu yang berbeda konsentrasinya. Menurut Lai et al., dalam penentuan daya reduksi, reduktor (antioksidan) dalam sampel akan mereduksi Fe^{3+} (kompleks kalium ferisianida $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$) menjadi Fe^{2+} (bentuk ferro).

Reaksinya adalah sebagai berikut :



Setelah itu, asam trikloroasetat 10% ditambahkan ke dalam larutan agar kompleks kalium ferisianida mengendap dan dapat dipisahkan. Proses pemisahannya dibantu dengan sentrifugasi. Supernatan yang diambil direaksikan dengan larutan FeCl_3 0,1% untuk membentuk kompleks berwarna biru kehijauan sehingga dapat dibaca pada spektrofotometri pada panjang gelombang 700 nm. Terbentuknya warna biru kehijauan menyebabkan kenaikan pada nilai absorbansi sampel. Makin biru kehijauan warna yang terbentuk pada sampel makin tinggi nilai absorbansinya. Ini menunjukkan bahwa senyawa antioksidan yang terkandung dalam daun ungu tinggi. Menurut Yen dan Chen, ekstrak dengan daya reduksi tinggi merupakan donor elektron yang bagus yang memiliki kemampuan untuk menghentikan reaksi berantai radikal dengan cara mengubah radikal bebas menjadi produk yang lebih stabil. Aktivitas

antioksidan dari reduktor berdasarkan pada pemecahan rantai radikal akibat pemberian atom hidrogen.

Berdasarkan hasil yang diperoleh maka dapat diketahui bahwa hubungan antara kadar flavonoid total dan daya reduksi dari ekstrak etanol daun ungu ini menunjukkan peningkatan dengan bertambahnya konsentrasi, makin tinggi konsentrasi ekstrak maka makin besar kadar flavonoid total dan makin kuat kemampuan daya mereduksinya. Nilai inilah dapat dijadikan dasar untuk menggunakan antioksidan alami pengganti antioksidan sintetik dalam sediaan farmasetik, kosmetik, maupun pengobatan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) pada konsentrasi 2% sebesar 6,293 mg/100 g, 3% sebesar 7,856 mg/100 g, 4% sebesar 8,335 mg/100 g dan 5% sebesar 8,852 mg/100 g. Kandungan flavonoid total ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) meningkat secara signifikan dengan peningkatan konsentrasi yang diberikan.

2. Daya reduksi dari ekstrak etanol daun ungu (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff) ini memiliki kemampuan mereduksi yang cukup kuat hal ini ditunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak makin kuat kemampuan mereduksinya.

KEPUSTAKAAN

- Arini, Sri., Dani Nurmawan., Fin Alfiani., dan Triana Hertiani., 2003. *Daya Antioksidan Dan Kadar Flavanoid Hasil Ekstraksi Etanol-Air Daging Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.)*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Chang, C.C, Yang M.H, Wen H.M, Chern JC. *Estimation of total flavonoid content in propolis by two Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods*. J Food Drug Anal 2002; 10: 178-182
- Harborne, J.B., 1984. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Terbitan kedua. Penerbit ITB. Bandung.
- Katja, et al., 2009. *Potensi Daun Alpukat (Persea americana mill) Sebagai Sumber Antioksidan Alami*. Universitas Sam Ratulangi, Manado.
- Markham, K.R., 1988. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*. Diterjemahkan oleh Kokasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.
- Robinson., T., 1991. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB. Bandung.
- Sthal, Egon. 1985. *Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopi*. Penerbit ITB. Surabaya.
- Sri, Paini Widyawati. 2008. *Evaluasi Aktivitas Antioksidatif Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea Indica Less) Berdasarkan Perbedaan Ruas Daun*. Penerbit IPB. Bandung
- Sandi, Evika Savitri. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. UIN Malang Press. Malang