

PENETAPAN KADAR TOTAL FENOL DAN FLAVONOID FRAKSI N-HEKSAN DAN FRAKSI DIKLOROMETANA DARI EKSTRAK ETANOL RIMPANG *ACORUS* SP.

Shari Dilvia Rafa¹, Ressi Susanti², Nera Umillia Purwanti³
123 Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura
Jl. Prof. Dr. H. Hadari Nawawi Pontianak

ABSTRAK

Tumbuhan rimpang jeringau merah *Acorus* sp. dapat diterapkan untuk mengobati beberapa gangguan kesehatan pada tubuh manusia yang disebabkan oleh radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total. Penentuan, penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total tersebut menggunakan fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana ekstrak etanol rimpang jeringau merah *Acorus* sp. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana ekstrak etanol rimpang jeringau merah *Acorus* sp. memiliki nilai kadar fenolik total sebesar $116,693 \pm 3,807$; $121,192 \pm 1,146$ mg ekuivalen asam galat per gram fraksi dan nilai kadar flavonoid total sebesar $21,003 \pm 0,248$; $22,175 \pm 0,137$ mg ekuivalen kuersetin per gram fraksi.

Kata kunci: *Acorus* sp., jeringau merah, fenolik, flavonoid, spektrofotometri Uv-Vis,

ABSTRACT

The rhizomes of red sweet flag *Acorus* sp. plants can be applied to treat some health problems in the human body caused by free radicals. This study aims to determine of total phenolic and flavonoid content. Determination of total phenolic and flavonoid assay using hexane fraction and dichloromethane fraction of ethanol extract of the rhizomes of red sweet flag *Acorus* sp. The results showed that the hexane fraction and dichloromethane fraction of ethanol extract the rhizomes of red sweet flag *Acorus* sp. having total phenolic content was $116,693 \pm 3,807$; $121,192 \pm 1,146$ mg gallic acid equivalents per gram fractions and the total flavonoid content was $21,003 \pm 0,248$; $22,175 \pm 0,137$ mg quercetin equivalents per gram fractions

Keywords: *Acorus* sp., red sweet flag, phenolic, flavonoid, spectrophotometri Uv-Vis

PENDAHULUAN

Penggunaan senyawa antioksidan semakin berkembang baik untuk makanan maupun pengobatan seiring dengan bertambahnya pengetahuan tentang radikal bebas. Kalimantan Barat merupakan provinsi yang memiliki berbagai kekayaan alam yang menyimpan berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat sebagai obat dan dihuni oleh berbagai macam suku. Salah satu tanaman endemik Kalimantan Barat yang sering digunakan masyarakat suku Dayak dalam pengobatan tradisional adalah jeringau merah (*Acorus sp.*). Jeringau merah memiliki karakteristik seperti jeringau putih tetapi memiliki pangkal daun berwarna merah serta rimpang berwarna coklat kemerahan⁽¹⁾.

Berdasarkan hasil penelitian Sofyan *et al.* menjelaskan bahwa perbandingan aktivitas antioksidan antara ekstrak rimpang jeringau putih dan rimpang jeringau merah didapatkan perbandingan masing-masing adalah 0,22 mg/ml dan 0,49 mg/ml⁽²⁾. Sedangkan menurut penelitian Hasan, uji aktivitas antioksidan ekstrak kasar rimpang jeringau putih dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) menghasilkan nilai IC₅₀ dari ekstrak etanol sebesar 137,7 mg/L⁽³⁾. Menurut penelitian Srividya *et al.* pada tingkat fraksi didapatkan bahwa fraksi kloroform dan fraksi etil asetat dari ekstrak hidroetanol rimpang jeringau putih diperoleh nilai IC₅₀ 40±2,074 µg/ml dan 30±1,949 µg/ml⁽⁴⁾. Selain itu penelitian Kho See Li *et al.* didapat ekstrak metanol rimpang jeringau putih memiliki persentase hambatan radikal bebas paling kuat serta total flavonoid paling tinggi dibandingkan ekstrak air dan heksan dengan karakteristik kepolaran metanol mirip dengan etanol⁽⁵⁾.

Penetapan kadar total fenol dan flavonoid dilakukan sebagai gambaran melihat kemampuan antioksidan untuk menghambat radikal bebas. Dengan demikian, dari latar belakang di atas, maka

dilakukan penelitian mengangkat permasalahan tersebut untuk dilakukan penelitian dengan melihat nilai total flavonoid dan total fenol pada fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana ekstrak etanol rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain rotari evaporator, timbangan analitik, batang pengaduk, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet volume, pipet ukur, ball filler, corong, botol hitam, bejana maserasi, oven, seperangkat alat gelas (*Pyrex*[®]), *grinder* simplisia, lemari pendingin, chamber KLT, desikator, krusibel porselen, instrument spektrofotometri Uv-Vis (*Shimadzu* tipe MR 2510), penjepit tabung reaksi, pipa kapiler, sendok *stainless steel*, sendok penyusut, Vortex, wadah kaca.

Bahan penelitian yang akan digunakan antara lain rimpang jeringau merah, etanol 96%, aquades, DPPH (Merck), etil asetat, n-heksana, diklorometana, butanol, aquades, larutan AlCl₃ (Merck), asam asetat glasial (Merck), *Folin-Cialcateu* (Merck), kuersetin, asam galat, kertas saring, plat KLT (Silica Gel GF₂₅₄) (Merck), FeCl₃ (Merck), natrium karbonat (Merck), natrium asetat (Merck)

Penyiapan Sampel

Sampel yang digunakan berupa bagian rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*) yang diperoleh dari 4 Kg tanaman jeringau merah. Jeringau merah diperoleh dari daerah Tempat Budi Daya Ahmad Yani, Kabupaten Kubu Raya, Provinsi Kalimantan Barat. Sampel rimpang jeringau merah yang diperoleh sebanyak 1,7518 Kg disortir basah, kemudian dibersihkan, dirajang, lalu dikeringkan dengan oven pada suhu 80°C sampai kering. Setelah itu dilakukan sortasi kering dan dihaluskan dengan cara diblender

hingga diperoleh serbuk halus yang homogen.

Ekstraksi dan Fraksinasi

Sebanyak 300 g simplisia kering dimasukkan kedalam bejana maserasi dan ditambahkan pelarut etanol 96% sampai semua sampel terendam oleh pelarut. Maserasi dilakukan selama sepuluh hari dan setiap 24 jam pelarut diganti. Hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Filtrat yang diperoleh lalu dikumpulkan dan disaring. Kemudian filtrat dipisahkan menggunakan oven pada suhu 60°C hingga menjadi ekstrak kental.

Fraksinasi dilakukan menggunakan metode Firdausi dengan sedikit modifikasi⁽⁶⁾. Sebanyak 27,67 g ekstrak dimasukkan ke dalam corong pisah, difraksinasi berturut-turut dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut n-heksan, diklorometana, etil asetat, butanol, dan air. Ekstraksi dilakukan replikasi sebanyak dua kali untuk tiap fraksi menggunakan pelarut dengan volume 350 mL. Hasil fraksinasi dikumpulkan dan dipisahkan dengan oven pada suhu 60°C untuk fraksi n-heksan dan suhu 40°C untuk fraksi diklorometana hingga diperoleh fraksi kental. Fraksi n-heksan dan diklorometana selanjutnya diuji kadar total fenol, total flavonoid.

Uji Kualitatif Fenol Flavonoid secara KLT

Uji pendahuluan pada fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana rimpang jeringau merah diawali dengan mengaktifkan plat KLT pada oven dengan suhu 105°C selama 10 menit. Plat KLT selanjutnya ditotolkan fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana pada jarak 0,5 cm dari batas bawah plat. Penotolan sampel dilakukan secara perlahan. Tiap-tiap penotolan, bercak dibiarkan hingga kering kemudian dielusi menggunakan fase gerak butanol : asam asetat : air (6 : 1 : 3). Jarak

elusi 6,5 cm, setelah dikembangkan sampai batas pengembangan, elusi dihentikan, lalu lempeng diangin-anginkan sampai kering. Lempeng KLT kemudian diamati pada sinar tampak, sinar UV 366 nm, sinar UV 254 nm, dan disemprotkan dengan larutan FeCl₃ 1%, AlCl₃ 1%. Bercak diperiksa setelah penyemprotan. Senyawa aktif mengandung fenol dengan bercak hitam, flavonoid dengan bercak kuning, dan aktivitas penangkap radikal bebas akan menunjukkan bercak berwarna kuning pucat dengan latar belakang ungu.

Pengujian Kadar Fenol Total

Fraksi n-heksan dari ekstrak rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*) sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, ditambah metanol hingga tanda batas., lalu digojog homogen. Larutan fraksi n-heksan tersebut diambil 0,75 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu ditambah metanol hingga tanda batas dan digojog homogen. Fraksi diklorometana dari ekstrak rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*) sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml, ditambah metanol hingga tanda batas., lalu digojog homogen. Larutan fraksi diklorometana tersebut diambil 1,5 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu ditambah metanol hingga tanda batas dan digojog homogen. Selanjutnya diambil 1 ml dari larutan tersebut lalu dimasukkan dalam labu ukur 10 ml kemudian pereaksi Folin ciocalteau 0,5 ml dan 2 ml natrium karbonat 10% selanjutnya ditambah metanol hingga tanda batas dan digojog homogen. Larutan yang telah direaksikan tersebut dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup lembar alumunium, kemudian dipanaskan 50°C selama 5 menit. Campuran larutan diinkubasi 10 menit dan diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 757,5 nm⁽⁷⁾. Kadar fenol total dihitung dengan asam galat sebagai kurva baku, persamaan atau dengan rumus⁽⁸⁾ :

$$\text{Kadar Fenol Total (mg GAE/g sampel)} \\ = \frac{(Y \times N \times V)}{W}$$

Keterangan : Y = konsentrasi fenol contoh yang dihitung dengan menggunakan persamaan kurva standard (mg/L)
N = nilai pengenceran.
V = volume hasil ekstraksi (mL).
W = berat fraksi (g).

Pengujian Kadar Flavonoid Total

Uji penentuan kadar flavonoid total menggunakan metode Chang. Fraksi n-heksan dari ekstrak rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*) sebanyak 10 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, ditambah metanol hingga tanda batas., lalu digojog homogen. Larutan tersebut diambil 2,5 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu ditambah metanol hingga tanda batas dan digojog homogen. Fraksi diklorometana dari ekstrak rimpang jeringau merah (*Acorus sp.*) sebanyak 5 mg dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, ditambah metanol hingga tanda batas., lalu digojog homogen. Larutan tersebut diambil 2,5 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 ml, lalu ditambah metanol hingga tanda batas dan digojog homogen. Selanjutnya diambil 2 ml dari larutan tersebut lalu ditambahkan 0,1 ml alumunium triklorida, 0,1 ml na-asetat 1 M, dan 2,8 ml aqua pro injeksi. Campuran larutan tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruangan. Ukur serapan pada panjang gelombang 433,5 nm serta kuersetin sebagai baku pembanding⁽⁷⁾. Kadar flavonoid dengan metode alumunium klorida dapat dihitung dengan rumus berikut⁽⁸⁾.

$$\text{Kadar Flavonoid Total (mg QE} \\ \text{/g sampel)} = \frac{(Y \times N \times V)}{W}$$

Keterangan : Y = konsentrasi flavonoid contoh yang dihitung dengan

menggunakan persamaan kurva standard (mg/L)

N = nilai pengenceran.

V = volume hasil ekstraksi (L).

W = berat fraksi (g).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyiapan Sampel

Sebanyak 1,7518 kg rimpang jeringau merah disortasi basah untuk memisahkan pengotor seperti tanah ataupun bagian tanaman yang tidak diperlukan dalam penelitian. Rimpang jeringau merah kemudian dibersihkan dari akarnya, dicuci kemudian dirajang untuk memperbesar luas permukaan sampel sehingga pelarut lebih mudah berpenetrasi ke dalam sel sehingga penarikan senyawa kimia yang terkandung dalam sampel lebih maksimal. Setelah proses perajangan, dilakukan proses pengeringan dengan cara dioven pada suhu 80 °C. Selanjutnya rimpang jeringau merah yang telah kering disortasi kering untuk memisahkan dari pengotor-pengotor yang masih ada kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diperoleh serbuk simplisia kering sebanyak 531,18 gram.

Ekstraksi dan Fraksinasi

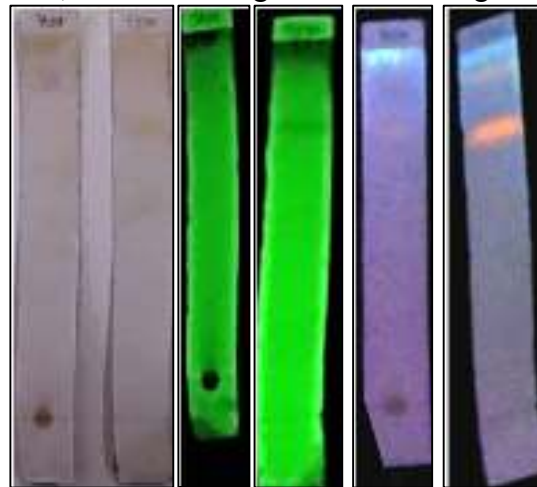
Proses ekstraksi simplisia rimpang jeringau merah dilakukan dengan cara metode maserasi menggunakan pelarut etanol teknis 96%. Maserasi merupakan metode ekstraksi dingin yang banyak digunakan dan paling sederhana di antara metode yang lain, yaitu hanya dengan merendam sampel dengan pelarut yang sesuai. Sampel dibuat dalam bentuk serbuk dengan tujuan memperluas bidang sentuh antara etanol dan serbuk simplisia, maka penyarian dapat lebih efektif. Pada maserasi ini menggunakan simplisia kering rimpang jeringau merah sebanyak 300 gram. Maserasi dilakukan dengan pelarut etanol teknis 96% sebanyak 200 mL per hari.

Maserasi dihentikan pada saat maserat terlihat bening yakni pada hari ke-10 maserasi. Total maserat yang diperoleh sebanyak ± 2 liter. Filtrat hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring kemudian dipisahkan dengan *rotatory evaporator* dan dibantu dengan induksi panas dari oven bersuhu $\pm 60^\circ\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 33,87 gram dengan rendemen 11,29%.

Fraksinasi yang dilakukan dengan metode partisi pada ekstrak etanol rimpang jeringau merah bertujuan untuk memisahkan senyawa berdasarkan kelarutannya terhadap pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda. Sebanyak 27,67 gram ekstrak dilarutkan ke dalam air kemudian ditambahkan n-heksan. Digojog dan diperoleh fraksi yang terpisah antara fase atas yakni fraksi n-heksan dan fase bawah yakni fraksi air. Dikeluarkan fraksi air dan fraksi n-heksan secara terpisah. Fraksinasi diulang hingga diperoleh warna bening pada fase atas. Fraksinasi dilanjutkan dengan menggantikan pelarut n-heksan dengan pelarut yang tingkat kepolarannya lebih tinggi dibanding n-heksan dalam hal ini pelarut diklorometana, etil asetat, selanjutnya butanol hingga jenuh dengan urutan pelarut organik yang tingkat kepolarannya semakin tinggi. Semua fraksi terpisah tersebut kemudian diubah menjadi fraksi kental dengan menguapkan kandungan pelarut didalamnya, dalam hal ini sampel yang diambil untuk diteliti adalah fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana. Kedua fraksi tersebut diuapkan dengan menggunakan bantuan induksi panas dari oven. Perolehan fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana dari ekstrak etanol jeringau merah masing-masing adalah 0,5 gram dan 0,1 gram dari total 27,67 gram ekstrak dengan rendemen 1,807% dan 0,361%.

Uji Kualitatif Fenol Flavonoid secara KLT

Kromatografi lapis tipis (KLT) dalam penelitian ini berguna untuk mendukung data uji kuantitatif menggunakan reagen dengan melihat pola spot yang dihasilkan dan warna setelah disemprot reagen AlCl_3 1% pada senyawa flavonoid, FeCl_3 1% pada senyawa fenol. Sistem KLT yang dilakukan terdiri dari fase diam silika gel 60 GF₂₅₄ dan fase gerak campuran pelarut yang mengandung butanol : asam asetat : dan air (6:1:3). Bercak diperiksa setelah penyemprotan. Senyawa aktif mengandung fenol dengan bercak hitam, flavonoid dengan bercak kuning.



Gambar 1. Uji Kualitatif KLT Fenol Flavonoid

Pengujian Kadar Fenol Total

Penetapan kadar fenol total fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana menggunakan asam galat sebagai larutan standar. Larutan fraksi yang telah direaksikan kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum asam galat yang telah diuji sebelumnya yaitu pada 757,5 nm. Persamaan regresi liner kurva baku $y = 0,01216x + 0,0544$ digunakan untuk menghitung nilai kandungan fenolik total yang dinyatakan dalam mg ekuivalen asam

galat per gram fraksi. Hasil penetapan kandungan fenolik total fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana berturut-turut sebesar $116,693 \pm 3,807$ mg GAE/ gram sampel dan $121,192 \pm 1,146$ mg GAE/ gram sampel.

Pengujian Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana menggunakan kuersetin sebagai larutan standar. Larutan fraksi yang telah direaksikan kemudian diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang maksimum kuersetin yang telah diuji sebelumnya yaitu pada 433,5 nm. Persamaan regresi liner kurva baku $y = 0,03565x - 0,03267$ digunakan untuk menghitung nilai kandungan flavonoid total yang dinyatakan dalam mg ekuivalen kuersetin per gram fraksi. Hasil penetapan kandungan flavonoid total fraksi n-heksan dan fraksi diklorometana berturut-turut sebesar $21,003 \pm 0,248$ mg QE/ gram sampel dan $22,175 \pm 0,137$ mg QE/ gram sampel.

DAFTAR PUSTAKA

1. Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan. Jeringau Herbal dengan Segudang Manfaat. Ambon; 2013.
2. Sofyan A, Widodo E, Natsir H. Komponen Bioaktif, Aktivitas Antioksidan dan Profil Asam Lemak Ekstrak Rimpang Jeringau Merah (*Acorus sp.*) dan Jeringau Putih (*Acorus calamus*). Jurnal Teknologi Pertanian. 2017; 18(3): 173-180
3. Hasan MN. Pengaruh Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) dalam Beberapa Pelarut Organik terhadap Aktvitas Antioksidan dan Antifungi Secara *In Vitro* [Skripsi]. Malang: Fakultas Sains dan Teknologi, Jurusan Biologi, Universitas Islam Negeri (UIN)

- Maulana Malik Ibrahim Malang; 2015
4. Srividya AR, Aishwaria SN, Vishnuvarthan VJ. Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxicity Activity of Hydroethanolic Extract and its Fractions of *Acorus calamus linn.* International Journal of Pharmaceutical Research Scholars (IJPRS). 2014; 3(1): 114-125
 5. Kho See Li, Chan Sook Wah. Antioxidant and Antibacterial Activity of *Acorus calamus. L* Leaf and Rhizome Extracts. The Indonesian Journal of Clinical Nutrition (IJCN). 2017; 13(4): 144-158
 6. Firdausi I, Retnowati R, Sutrisno. Fraksinasi Ekstrak Metanol Daun Mangga Kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) dengan Pelarut N-Butanol. Kimia Student Journal. 2015 ; 1(1) : 785-790
 7. Isnindar, Setyowati, E.P., Wahyuono,S. Aktivitas Antioksidan Daun Kesemek (*Diospyros Kaki* L.F) dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Media Farmasi Indonesia. 2011. h.114.
 8. Sukmawati, Optimasi dan Validasi Metode Analisis dalam Penentuan Kandungan Total Flavonoid pada Ekstrak Daun Gedi Hijau (*abelmoscus manihot* l.) yang Diukur Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis. PHARMACONJurnal Ilmiah Farmasi – UNSRAT Vol. 7 No. 3 Agustus 2018