JURNAL KIMIA (*JOURNAL OF CHEMISTRY*) 19 (2), JULI 2025 **p-ISSN 1907-9850**
DOI: https://doi.org/10.24843/JCHEM.2025.v19.i02.p15 **e-ISSN 2599-2740**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA GOLONGAN FLAVONOID PADA EKSTRAK DAUN ANGGUR BALI (*Vitis vinifera* L.*)* YANG BERSIFAT ANTIOKSIDAN

A. A. Prayoga, N. M. Puspawati*, S. Wahjuni

Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jimbaran, Bali, Indonesia
Email: made_puspawati@unud.ac.id

Article Received on: 3th July 2025 Revised on: 21th June 2025 Accepted on: 13th July 2025

ABSTRAK

Radikal bebas merupakan suatu spesi yang dapat menyebabkan senyawa lain menjadi tidak stabil. Radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan kerusakan sel. Anggur Bali (*Vitis vinifera* L.) merupakan tanaman yang mengandung senyawa flavonoid sehingga berpotensi sebagai antioksidan untuk menghambat radikal bebas. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan hubungannya dengan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun anggur Bali, serta mengidentifikasi jenis senyawa flavonoid yang terkandung di dalamnya. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dan partisi, sedangkan proses isolasi dilakukan melalui metode kromatografi kolom. Uji aktivitas antioksidan ditentukan dengan metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) dan kandungan flavonoid total dengan metode kolorimetri. Identifikasi flavonoid dilakukan pada fraksi yang memiliki kandungan flavonoid tertinggi menggunakan spektrofotometer Ultraviolet-Visibel (Uv-Vis) dan Infra merah (FTIR). Hasil penelitian menunjukkan fraksi n-butanol memiliki kandungan flavonoid tertinggi sehingga diisolasi menggunakan kromatografi kolom menghasilkan 10 fraksi gabungan. Hasil uji aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol, fraksi n-butanol, dan isolat daun anggur Bali (fraksi A) memiliki nilai IC_{50} berturut-turut sebesar 88,94; 67,46; dan 52,07 ppm dan kadar flavonoid totalnya 9,24; 18,45; dan 35,71 mg*QE*/g. Hasil tersebut mengindikasikan adanya korelasi antara aktivitas antioksidan (IC_{50}) dengan kadar flavonoid total dengan nilai R^2 = 0,9293. Hasil analisis spektra infra merah (fraksi A) menunjukkan adanya gugus fungsi -OH, C=O, C=C aromatik, dan spektra UV-Vis dengan pereaksi geser menunjukkan bahwa isolat adalah flavonol dengan gugus –OH yang tersubstitusi pada atom C nomor 3, 5, 7, dan 4’ sehingga diduga merupakan senyawa atau turunan kaempferol.

Kata Kunci: anggur Bali (*Vitis vinifera* L.), antioksidan, flavonoid, kadar flavonoid total

ABSTRACT

Free radicals are substances that can cause other compuds to become unstable. Inside the body, free radicals can cause cell damage. Balinese grapes (*Vitis vinifera* L.) are plants that contain flavonoid compounds, making them potential as antioxidants for inhibiting free radicals. This study aims to determine the antioxidant activity (IC_{50}) and its relationship with the total flavonoid content of the ethanol extract of balinese grape leaves as well as to identify their flavonoid compounds. The extraction method used in this study is maceration and partition, while the isolation process using column chromatography. The antioxidant activity test was determined by DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*) method and the total flavonoid content by the colorimetric method. The identification of flavonoids was carried out on a fraction that had the highest flavonoid content using Ultraviolet-Visible (UV-Vis) and Infrared (FTIR) spectrophotometers. The results showed that the n-butanol fraction had the highest flavonoid content, so it was isolated using column chromatography that put out 10 combined fractions. The antioxidant activity test results of the ethanol extract, n-butanol fraction, and balinese grape leaves isolate (A fraction) had an IC_{50} values of 88,94; 67,46; and 52,07 ppm and the total flavonoid content 9,23; 18,45; and 35,71 mgQE/g. These results indicate a correlation between antioxidant activity (IC_{50}) and their total flavonoid contents with an R^2 value equals 0,9293. The results of the infrared spectrum analysis (fraction A) indicate the presence of functional groups -OH, C=O, aromatic C=C, and the UV-Vis spectrum with shift reagents suggest that the isolate is a flavonol with -OH groups substituted on carbon atoms number 3, 5, 7, and 4', suggesting it is a compound or derivative of kaempferol.

Keywords: balinese grape (*Vitis vinifera* L.), antioxidant, flavonoid, total flavonoid content

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah suatu senyawa yang berbahaya. Di dalam tubuh, radikal bebas dapat menyebabkan penyakit degeneratif seperti katarak, penuaan dini, rematik, liver, penyakit jantung koroner, dan sebagainya (Nur'amala, 2019). Radikal bebas dapat diartikan sebagai suatu atom/molekul yang mempunyai elektron tidak berpasangan. Elektron tidak berpasangan tersebut akan mengakibatkan suatu senyawa atau molekul lain menjadi lebih reaktif atau tidak stabil dengan cara melakukan pengikatan elektron dari molekul untuk mencari pasangan. Sel yang terserang oleh radikal bebas dapat merusak fungsi dari sel tersebut (Parwata, 2016).

Antioksidan merupakan suatu senyawa yang dapat menyerap atau menetralisir radikal bebas (Murray *et al*., 2019). Antioksidan dapat menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas. Selain itu, antioksidan juga berguna untuk mengatur agar tidak terjadi proses oksidasi berkelanjutan di dalam tubuh. Molekul ini memiliki struktur yang memungkinkannya untuk memberikan elektron kepada molekul radikal bebas tanpa mengganggu fungsinya dan akan tetap stabil, sehingga antioksidan dapat menghentikan reaksi berantai dari radikal bebas. (Parwata, 2016). Antioksidan alami dapat ditemukan pada tumbuhan. Aktivitas antioksidan pada suatu ekstrak tumbuhan diperankan oleh metabolit sekunder yang terdapat di dalamnya seperti alkaloid, saponin, tannin, terpenoid, flavonoid dan fenolik (Safitri *et al*., 2020).

Flavonoid adalah metabolit sekunder dari polifenol yang ditemukan secara luas pada tanaman serta makanan dan memiliki berbagai efek bioaktif termasuk antivirus, antiinflamasi kardioprotektif, antidiabetes, antikanker, antipenuaan, antioksidan, dan lain-lain (Vanessa *et al*., 2014). Flavonoid memiliki kemampuan sebagai antioksidan yang mampu mentransfer sebuah elektron atau sebuah atom hidrogen ke senyawa radikal bebas dengan menghentikan tahap awal reaksi. Menurut Treml and Smejkal (2016), senyawa flavonoid dan polifenol mempunyai kemampuan sebagai penangkap radikal bebas dan penghambat oksidasi lipid, sehingga menjadikan senyawa tersebut berpotensi sebagai agen antioksidan alami.

Anggur Bali (*Vitis vinifera* L.) adalah spesies anggur umum yang termasuk dalam genus Vitis dalam keluarga Vitaceae. *Vitis vinifera* L. memiliki varietas dengan biji, tanpa biji, berwarna merah, hitam, dan putih. Spesies ini lebih mudah ditemukan karena mendominasi anggur spesies lainnya sebesar 90%. Berbagai jenis senyawa fitokimia dapat ditemukan pada akar, batang, tebu, daun, biji, buah, ampas, dan kulitnya. Senyawa yang signifikan paling banyak ditemukan adalah senyawa fenolik, asam aromatik, proantosianidin, stilbenoid, dan flavonoid (Insanu *et al*., 2021). Adanya senyawa fenolik dan flavonoid juga didukung oleh penelitian Mukhriani *et al*. (2019) yang mengatakan bahwa daun anggur memiliki kandungan fenolik dan flavonoid dalam ekstrak etanol dengan kadar total berturut-turut sebesar 95,28 mg GAE/g dan 4,07 mgQE/g. Dikarenakan daun anggur mengandung senyawa flavonoid dan fenolik, maka daun anggur berpotensi memiliki aktivitas antioksidan.

Penelitian oleh Noor dan Gozali (2018), menemukan bahwa biji anggur memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 17,41 µg/mL. Studi di bidang buah anggur pada spesies yang sama juga dilakukan oleh Zubaidah dan Veronica (2014), yang mengatakan bahwa modifikasi cuka berbasis buah anggur utuh dengan proporsi buah:air 1:1 memiliki aktivitas antioksidan sebesar 59,49%. Andriani (2022) juga melakukan penelitian uji aktivitas antioksidan pada daun anggur dengan hasil nilai IC_{50} sebesar 34,2073 µg/mL. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas antioksidan (IC_{50}) dan hubungannya dengan kadar flavonoid total dari ekstrak etanol daun anggur Bali, serta mengidentifikasi jenis senyawa flavonoid yang terkandung di dalamnya.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah daun anggur Bali (*Vitis vinifera* L.) yang diperoleh dari Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali. Adapun bahan-bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, HCl,

serbuk Mg, H_2SO_4 pekat, NaOH 10%, n-heksana, etil asetat, n-butanol, kertas saring, metanol, DPPH, kuersetin, plat KLT silica gel GF_{254}, asam asetat, aquades, asam formiat, serbuk silica gel 60, glass wol, reagen sitroborat, $AlCl_3$, NaOAc, H_3BO_3, dan KBr.

Peralatan

Alat-alat penelitian yang digunakan adalah peralatan gelas, neraca analitik, oven, desikator, corong, corong pisah, pipet mikro, plat tetes, penangas air, penggaris, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis Shimadzu UV-1800, seperangkat alat FTIR Shimadzu IR Prestige-21, seperangkat alat TLC *Visualizer* 2 CAMAG, seperangkat alat *automatic sampler* ATS 4 CAMAG, seperangkat alat kromatografi kolom, botol vial, aluminium foil, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

Preparasi dan Ekstraksi Daun Anggur Bali

Sampel daun anggur Bali dikeringkan pada ruang tertutup dan dihindarkan dari sinar matahari selama 2 minggu. Sampel yang telah kering ditimbang dipotong menjadi kecil dan diukur kadar airnya. 500 gram simplisia daun anggur diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 24 jam. Hasil maserasi disaring dan filtrat dipisahkan. Residu dari maserasi diekstraksi kembali dengan pelarut yang sama selama 24 jam kemudian disaring dan filtrat digabungkan. Hasil maserasi dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kasar etanol.

Uji Fitokimia

Sejumlah ekstrak kasar daun anggur Bali dilakukan uji fitokimia sebagai skrining awal untuk menentukan metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Uji fitokimia ini meliputi uji alkaloid dengan pereaksi *mayer* dan *wagner*, fenolik dengan $FeCl_3$, flavonoid dengan 3 pereaksi (*Wilstater*, *Bate Smith*-Metcalfe, dan NaOH 10%), terpenoid dan steroid dengan pereaksi *Liberman-Buchard*, saponin dengan pereaksi HCl, serta tanin dengan pereaksi $FeCl_3$ dan asam sulfat.

Pengukuran Kadar Flavonoid Total

Larutan induk kuersetin 100 ppm dipipet berturut-turut sebesar 20, 40, 60, 80, dan 100 µL dan dicukupkan dengan etanol sampai 0,5 mL untuk mendapatkan larutan standar kuersetin 4, 8, 12, 16, dan 20 ppm. Masing-masing larutan ditambahkan 3 ml etanol, 0,2 mL $AlCl_3$ 10% dan 0,2 ml kalium asetat 1 M. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm untuk mencari persamaan regresi linier dari standar kuersetin.

Sejumlah ekstrak kasar, hasil partisi, dan isolat daun anggur ditimbang dan dilarutkan dengan etanol hingga 5 mL. Larutan sampel kemudian dipipet sebanyak 50 µL dan dijadikan 0,5 mL. Larutan sampel ditambahkan 3 ml etanol, 0,2 mL $AlCl_3$ 10% dan 0,2 mL kalium asetat 1 M. Campuran diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm. Kadar flavonoid total dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\text{kadar flavonoid} = \frac{\text{konsentrasi sampel} \times \text{volume} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{massa sampel}}$$

Uji Aktivitas Antioksidan

Sejumlah ekstrak kasar, hasil partisi, dan isolat daun anggur diencerkan dengan 5 mL metanol membentuk larutan induk. Larutan induk dipipet sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 µL kemudian diencerkan hingga 0,5 mL. Masing-masing sampel ditambahkan larutan larutan DPPH 0,1 mM sebanyak 3,5 mL (perbandingan 1:7) dan dicukupkan volumenya dengan metanol sampai 5 ml Masing-masing campuran diinkubasi pada suhu ruangan dalam keadaan gelap selama 30 menit. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis (disebut sebagai absorbansi sampel). Larutan blanko dibuat dengan cara mencampur 3,5 mL DPPH 0,1 mM dan diencerkan hingga 5 mL dengan metanol. Absorbansi blanko juga diukur (disebut sebagai absorbansi kontrol). Kemampuan antioksidan diukur berdasarkan penurunan absorbansi akibat inhibisi sampel. Nilai persen inhibisi (peredaman) radikal bebas dihitung dengan persamaan sebagai berikut:

$$\%\ \text{peredaman} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100$$

Nilai IC_{50} diukur dengan mencari persen inhibisi dari masing-masing absorbansi sampel dan diplotkan antara persen inhibisi

dengan konsentrasi. Nilai IC_{50} diperoleh dari perpotongan garis antara sumbu persen inhibisi dengan sumbu konsentrasi, kemudian dimasukkan ke dalam persamaan y = a + bx, dengan y = 50 dan nilai x menunjukkan IC_{50}.

Partisi Ekstrak Daun Anggur Bali

Ekstrak kasar hasil maserasi ditimbang dan dilarutkan dengan etanol dan air dengan perbandingan 3:7. Ekstrak air dipartisi dengan n-heksana dalam corong pisah sebanyak 20 mL dengan 12 kali pengulangan kemudian dipisahkan. Ekstrak air kembali dipartisi dengan etil asetat sebanyak 10 kali pengulangan kemudian dipisahkan. Sisa ekstrak air tersebut kemudian dipartisi kembali dengan n-butanol sebanyak 4 kali pengulangan kemdian dipisahkan. Partisi tersebut menghasilkan 4 fraksi yaitu fraksi hasil partisi n-heksana, etil asetat, n-butanol, dan air. Masing-masing fraksi dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator*.

Hasil partisi diuji secara fitokimia kembali dan dicari konsentrasi flavonoidnya secara semi kuantitatif. Fraksi yang menunjukkan flavonoid dengan konsentrasi tertinggi (dilihat dari tingkat perubahan warnanya) akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, ditentukan kadar flavonoid total dan diisolasi senyawa flavonoidnya.

Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid

Teknik pemisahan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) digunakan untuk memperoleh fase gerak (eluen) yang sesuai sehingga dapat memisahkan senyawa-senyawa pada sampel dengan baik. Fase diam yang digunakan pada kromatografi lapis tipis ini adalah plat KLT silika gel GF_{254}. Sampel fraksi daun anggur dilarutkan dengan eluen yang digunakan kemudian ditotolkan pada plat KLT dan dimasukkan ke dalam bejana yang telah dijenuhkan. Plat KLT dielusi di dalam bejana tesebut hingga eluen mencapai tanda batas yang telah tentukan. Eluen yang dapat digunakan untuk memisahkan senyawa flavonoid yaitu campuran n-butanol : asam asetat : n-heksana (3:3:2), etil asetat : asam asetat : asam formiat : air BAA (10:1:1:2,6), n-butanol : asam asetat : air BAA (4:1:5), dan n-butanol : etil asetat : asam asetat 10% (2:7:1). Plat KLT yang sudah terelusi dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan lalu disinari di bawah lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Eluen yang memberikan pola pemisahan noda yang paling baik akan dipilih sebagai fase gerak pada kromatografi kolom.

Pada kromatografi kolom, silika gel 60 sebanyak 60 gram dikeringkan dengan oven pada suhu 75°C selama 4 jam untuk mengaktivasi dan mengurangi kadar air kemudian didinginkan pada desikator untuk menstabilkan massanya. Silika gel dicampur dengan fase gerak sampai terbentuk bubur silika dan kolom diisi. Aliran fase gerak diatur ± 1 mL/menit. Eluat ditampung setiap 3 mL. Masing-masing eluat dielusi menggunakan KLT dan dikelompokkan berdasarkan kesamaan pola menggunakan reagen penampak noda sitroborat. Fraksi yang diduga mengandung senyawa flavonoid kemudian dilakukan identifikasi golongan flavonoidnya menggunakan metode spektroforometri UV-Vis dengan pereaksi geser dan Fourier Transform Infra Red (FTIR). Analisis dengan FTIR dilakukan pada rentang bilangan gelombang 4500 – 300 cm^{-1}. Pengukuran spektrum UV-Vis dilakukan pada panjang gelombang 200 – 400 nm. Analisis dilakukan dengan melarutkan 0,7 mg isolat dalam 10 mL metanol dan ditambahkan pereaksi geser NaOH 2M, NaOH 2M setelah 5 menit, NaOAc, NaOAc + H_3BO_3, $AlCl_3$, dan $AlCl_3$ + HCl.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi dan Ekstraksi Daun Anggur Bali

Pemotongan daun anggur hingga kecil bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel. Besarnya luas permukaan sampel mempengaruhi proses ekstraksi. Luas permukaan yang lebih besar akan meningkatkan interaksi kontak dengan pelarut selama ekstraksi, sehingga proses ekstraksi menjadi lebih efektif. Pengeringan sampel bertujuan untuk mengurangi kadar air. Kadar air yang berlebihan dapat menyebabkan mudahnya pertumbuhan mikroba atau jamur pada simplisia. Adanya mikroba atau jamur pada simplisia dapat mengakibatkan rusaknya senyawa yang ingin diekstrak dan menghasilkan ekstrak dalam jumlah yang sedikit (Siswati, 2020). Analisis kadar air disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Penentuan Kadar Air Simplisia Daun Anggur Bali

Cawan	Massa Cawan (g)	Massa Cawan + Sampel (g)		Kadar Air (%)
		Sebelum dioven	Setelah dioven	
1	200,7486	205,7490	205,3406	8,17
2	200,6381	205,6303	205.2242	8,13
3	200,6420	205,6401	205,2308	8,19
% Kadar Air Rata-rata				8,16

Hasil pengujian menunjukkan kadar air rata-rata dari sampel sebesar 8,16%. Persyaratan kadar air menurut parameter standar simplisia yang berlaku adalah tidak boleh lebih dari 10% (BPOM, 2014). Berdasarkan parameter tersebut, kadar air rata-rata pada simplisia telah memenuhi standar.

Metode maserasi dipilih karena metode tersebut merupakan metode ekstraksi dingin (tidak melibatkan pemanasan), menghindari kerusakan zat aktif yang terdapat pada simplisia. Pelarut etanol dipilih karena etanol merupakan pelarut organik yang efektif untuk menarik senyawa-senyawa metabolit sekunder dari yang bersifat polar, semi polar, atau non polar. Hal ini dikarenakan etanol memiliki gugus hidroksi (-OH) yang bersifat polar dan gugus etil (-C_2H_5) yang bersifat non polar sehingga etanol juga dapat disebut sebagai pelarut universal. Etanol juga dapat mengekstrak senyawa flavonoid (Mukhriani *et al*., 2019). Hasil maserasi dari 500 g simplisia menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 47,60 g dengan rendemen 9,52%.

Uji Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan untuk memberikan gambaran tentang golongan senyawa yang terkandung dalam tanaman yang sedang diteliti. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol daun anggur Bali disajikan pada Tabel 2. Hasil uji fitokimia pada Tabel 2. menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun anggur Bali mengandung senyawa golongaan fenolik, flavonoid, terpenoid, steroid, dan saponin, serta tidak mengandung senyawa golongan alkaloid dan tanin.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Anggur Bali

Uji Fitokimia	Pereaksi	Pengamatan	Hasil
Alkaloid	*Mayer*	Tidak terjadi perubahan	-
	Wagner	Tidak terjadi perubahan	-
Fenolik	$FeCl_3$	Hitam	+
	Wilstater	Merah	+
Flavonoid	*Bate Smith- Metcalfe*	Merah	+
	NaOH 10%	Kuning	+
Terpenoid	*Liberman-Buchard*	Ungu	+
Steroid	*Liberman-Buchard*	Biru	+
Saponin	Aquadest + HCl	Busa konstan	+
Tanin	$FeCl_3$ + asam sulfat	Tidak terjadi perubahan	-

Partisi Ekstrak Daun Anggur Bali

Partisi dilakukan untuk memisahkan ekstrak kasar etanol menjadi beberapa fraksi berdasarkan tingkat kepolarannya. Hal ini dikarenakan etanol termasuk pelarut universal (dapat melarutkan sebagian besar bahan kimia), sehingga perlu dilakukan pemisahan lebih lanjut. Pemisahan secara partisi dilakukan

dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut dengan perbedaan polaritas yang tinggi yaitu dari n-heksana yang bersifat non polar, etil asetat bersifat yang semi polar, dan n-butanol yang bersifat lebih polar daripada etil asetat..

Ekstrak kasar etanol dilarutkan dengan campuran etanol:air (3:7) dan etanolnya diuapkan menggunakan *vacum rotary evaporator*. Karena titik didih etanol lebih rendah dibandingkan dengan titik didih air, maka etanol akan menguap terlebih dahulu menyisakan ekstrak air. Ekstrak air kemudian dipartisi dengan n-heksana, etil asetat, dan n-butanol menghasilkan 4 ekstrak.

Masing-masing ekstrak dari hasil partisi (disebut fraksi) kemudian dilakukan uji semi kuantitatif flavonoid menggunakan pereaksi fitokimia untuk flavonoid yaitu HCl dan Mg, H_2SO_4 pekat, dan pereaksi NaOH 10%. Fraksi yang meunjukkan perubahan warna yang paling pekat dilanjutkan dengan uji aktivitas antioksidan, kadar flavonoid total, dan isolasi flavonoid. Hasil uji semi kuantitatif flavonoid disajikan pada Gambar 1.

Perubahan warna dapat menjadi tolak ukur banyak atau sedikitnya flavonoid yang terkandung dalam fraksi. Hal ini dikarenakan keberadaan flavonoid dalam fraksi akan bereaksi dengan pereaksi dan membentuk senyawa kompleks yang berwarna khas. Semakin signifikan perubahan warna dari suatu uji, maka semakin banyak pula jumlah flavonoid yang bereaksi dengan pereaksi dan mengindikasikan kadar flavonoidnya juga tinggi. Karena fraksi n-butanol memberikan perubahan warna yang paling signifikan, maka fraksi n-butanol dilanjutkan dengan dilakukan pengukuran kadar flavonoid total, uji aktivitas antioksidan, dan isolasi senyawa flavonoid.

Gambar 1. Hasil Uji Semi Kuantitatif Kadar Flavonoid

Isolasi Senyawa Flavonoid

Pemilihan fase gerak terbaik dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Hasil dari KLT disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pemilihan Fase Gerak Terbaik

No	Fase Gerak	Perbandingan	Jumlah Noda	Nilai Rf
1	n-Butanol : Asam Asetat : n-Heksana	3:3:2	5	0,49;0,62;0,71;0,78;0,83
2	Etil asetat : Asam Asetat : Asam Formiat : Air	10:1:1:2,6	7	0,37;0,43;0,50;0,55;0,67;0,92; 0,96
3	n-Butanol :Asam Asetat : Air (BAA)	4:1:5	8	0,25;0,32;0,46;0,55;0,62;0,67; 0,78;0,84
4	n-Butanol : Etil Asetat : Asam Asetat 10%	2:7:1	10	0,08;0,14;0,18;0,32;0,48;0,54; 0,67;0,72;0,91;0,97

Hasil pemilihan fase gerak terbaik dari Tabel 3. menunjukkan bahwa campuran n-Butanol : Etil Asetat : Asam Asetat 10% dengan perbandingan (2:7:1) menggunakan penampak noda sitrobrat memberikan pola pemisahan yang terbaik yaitu sebanyak 10 noda. Dikarenakan fase gerak tersebut memberikan hasil terbaik, maka fase gerak tersebut yang akan digunakan pada kromatografi kolom.

Pemisahan fraksi n-butanol daun anggur Bali dengan kromatografi kolom

menghasilkan eluat sebanyak 240 botol vial. Eluat kemudian dilanjutkan dengan KLT penggabungan. KLT penggabungan dilakukan bertujuan untuk mengetahui pola pemisahan pada masing-masing eluat. Eluat yang menghasilkan pola pemisahan yang sama akan digabungkan ke dalam kode fraksi yang sama. Hasil pemisahan KLT penggabungan disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pemisahan KLT Penggabungan

Fraksi	Jumlah Noda	Rf	Warna Fraksi	Warna noda Di bawah UV 366 nm
A (1-4)	1	0,94	Kuning	Kuning terang
B (5-9)	1	0,93	Kuning	Biru
C (10-25)	2	0,43;0,68	Kuning	Biru, cokelat
D (26-38)	3	0,11; 0,31;0,51	Kuning	Biru muda
E (39-50)	5	0,11;0,30;0,36;0,44;0,54	Kuning	Cokelat, biru
F (51-66)	5	0,11;0,26;0,30;0,38;0,47	Kuning bening	Cokelat, biru muda
G (67-95)	6	0,26;0,46;0,69;0,81;0,91	Kuning bening	Biru, biru, kuning
H (96-116)	3	0,11;0,17;0,27	Kuning bening	Kuning, ungu
I (117-140)	3	0,08;0,16	Kuning pekat	Kuning pudar
J (141-240)	2	0,01;0,05	Kuning pekat	Kuning

Fraksi eluat (hasil isolasi) yang dilakukan uji aktivitas antioksidan, kadar flavonoid total, dan identifikasi senyawa adalah fraksi yang memberikan warna kuning terang di bawah lampu UV 366 nm dengan penampak noda sitroborat. Hal ini dikarenakan reagen sitroborat yang mengandung asam sitrat dan asam borat yang merupakan pereaksi spesifik berkepekaan tinggi untuk mendeteksi flavonoid dan spesifik untuk gugus orto-dihidroksi dan memberikan warna nyala kuning di bawah lampu UV 366. Berdasarkan Tabel 4., fraksi A memiliki warna nyala kuning paling terang. Sehingga fraksi A (1-4) yang akan dilakukan uji aktivitas antioksidan, kadar flavonoid total, dan identifikasi senyawa flavonoid.

Pengukuran Kadar Flavonoid Total

Penentuan kadar flavonoid diawali dengan membuat kurva regresi linier dari standar kuersetin. Hasil uji penentuan kurva regresi linier standar kuersetin disajikan pada Tabel 5.

Hasil pembuatan kurva standar kuersetin menunjukkan kurva baku dengan persamaan regresi linier y = 0,0022x – 0,0001 nilai R^2 (koefisien determinasi) sebesar 0,9992. Kandungan flavonoid total dalam tumbuhan dinyatakan dalam satuan mg*QE*/g *(Quercetine Equivalent)* yaitu jumlah kesetaraan miligram kuersetin dalam 1 gram massa ekstrak.

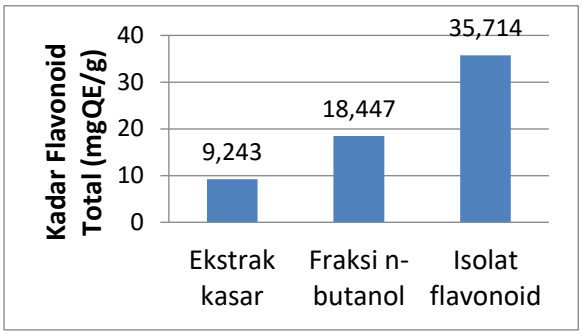
Tabel 5. Hasil Penentuan Kurva Regresi Linier Standar Kuersetin

Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
0	0,000
4	0,008
8	0,018
12	0,027
16	0,035
20	0,044

$AlCl_3$ akan membentuk kompleks asam yang stabil dengan C-4 gugus keton, lalu dengan C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol. Selain itu $AlCl_3$ juga dapat membentuk kompleks asam yang labil dengan gugus ortodihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid sehingga akan mempunyai serapan maksimum pada panjang gelombang 430 nm. Penambahan kalium asetat bertujuan untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visible. Hasil kadar flavonoid total disajikan pada Gambar 2.

Berdasarkan Gambar 2. kadar flavonoid total pada isolat menunjukkan hasil yang paling tinggi (34,71 mg*QE*/g) dibandingkan dengan ekstrak kasar (9,24 mg*QE*/g) dan hasil fraksi n-butanol (18,45 mg*QE*/g). Hal ini dikarenakan pada pemisahan lebih lanjut komponen flavonoid menjadi lebih terkonsentrasi dan murni, sehingga menghasilkan warna kompleks yang lebih

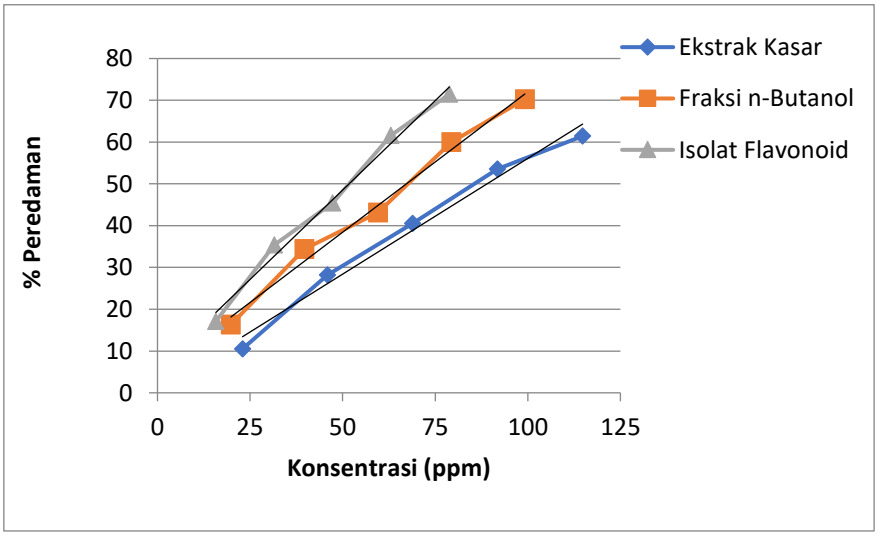
pekat dan meningkatkan kadar flavonoid total dalam isolat.



Gambar 2. Hasil Kadar Flavonoid Total

Uji Aktivitas Antioksidan

Absorbansi DPPH diukur pada panjang gelombang 517 nm. Intensitas warna dari radikal bebas DPPH yang berwarna ungu berkurang seiring dengan penambahan antioksidan menjadi berwarna kuning. Pengurangan intensitas warna yang terjadi berhubungan dengan jumlah elektron DPPH yang menangkap atom hidrogen dari senyawa antioksidan. Perubahan warna dari ungu menjadi kuning disebabkan karena atom N pada DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan menyebabkan terjadinya transisi n-σ^*. Hal ini membuat DPPH yang awalnya berwarna ungu dengan λ_{maks} 517 nm berubah menjadi DPPH-H yang berwarna kuning dengan λ_{maks} 450-480 nm, sehingga nilai absorbansi DPPH menurun (Moniharapon *et al*., 2016). Semakin besar penurunan absorbansinya, maka semakin kuat aktivitas antioksidannya**.** Hasil uji aktivitas antioksidan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan

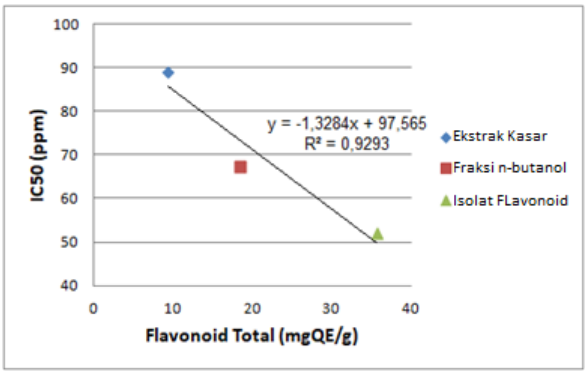
Gambar 3. menunjukkan hubungan antara konsentrasi sampel dengan persen peredaman radikal DPPH. Semakin besar konsentrasi sampel yang digunakan, maka semakin besar juga persentasi DPPH yang dapat diredam. Berdasarkan persamaan regresi linier dari masing-masing sampel, variabel y diberi nilai 50 untuk mencari nilai IC_{50}. Sehingga kita mendapatkan nilai IC_{50} untuk ekstrak kasar sebesar 88,94; fraksi n-butanol 67,46; dan isolat flavonoid 52,07 ppm. Ketiga sampel termasuk ke dalam aktivitas antioksidan yang kuat (Putri dan Hidajati, 2015).

Berdasarkan Gambar 3 juga didapat bahwa pada konsentrasi sampel yang sama menghasilkan aktivitas antioksidan yang berbeda. Hasil menunjukkan bahwa aktivitas antioksidan ekstrak kasar < fraksi n-butanol < isolat flavonoid. Semakin banyak pemisahan yang dilakukan, maka semakin tinggi aktivitas antioksidan dari sampel. Hal ini dikarenakan pada jumlah yang sama senyawa flavonoid lebih terkonsentrasi dan sedikit senyawa lainnya, sehingga DPPH yang dapat diredam lebih banyak mengakibatkan aktivitas

antioksidan yang semakin tinggi. Aktivitas antioksidan dimiliki oleh isolat flavonoid

Hubungan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan

Berdasarkan data yang diperoleh, dibuatkan grafik dengan plot antara kadar flavonoid total (mg*QE*/g) dan aktivitas antioksidan (IC_{50}). Hubungan kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Hubungan Kadar Flavonoid dengan Aktivitas Antioksidan

Dari hubungan kadar flavonoid total (sumbu x) dan nilai IC_{50} (sumbu y) diperoleh koefisien determinasi (R^2 = 0,9293). Hal ini menunjukkan adanya hubungan antara kadar flavonoid total dengan aktivitas antioksidan karena nilai R^2 yang mendekati satu ($R^2 \geq 0,9$). Semakin tinggi kandungan flavonoid total pada daun anggur Bali, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya (nilai IC_{50}-nya semakin rendah). Hal ini menunjukkan bahwa 92,93% aktivitas antioksidan dari daun anggur Bali disebabkan karena adanya senyawa flavonoid. Senyawa-senyawa flavonoid dan fenolik yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa yang mempunyai gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus –OH dan –OR (Najmudin *et al*., 2023). Mekanisme kerja aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh konsentrasi dan struktur kimia dari flavonoid. Struktur tersebut meliputi o-dihidroksi (katekol) pada cincin B yang sebagai target radikal dan donor elektron, gugus α-keto dengan konjugasi ikatan rangkap C2-C3 yang berperan untuk meningkatkan kapasitas *scavenging* radikal dan delokalisasi elektron cincin B (Oktavia dan Sutoyo, 2021).

Sebanyak 7,07 % aktivitas antioksidan dari daun anggur Bali diperkirakan dipengaruhi oleh kandungan selain dari senyawa flavonoid. Berdasarkan penelitian Goufo *et al*. (2020), daun anggur juga mengandung senyawa polifenol non-flavonoid lainnya seperti asam galat, asam kuinat, asam kafeat, kumarin, dan resveratrol. Senyawa-senyawa tersebut juga berkontribusi pada aktivitas antioksidan yang dihasilkan sampel karena termasuk polifenol yang memiliki gugus hidroksi yang tersubstitusi pada posisi orto atau para terhadap gugus –OH dan –OR (Najmudin *et al*., 2023).

Identifikasi Senyawa Flavonoid

Penentuan spektrum dari menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. menunjukkan bahwa sebelum ditambahkan pereaksi geser isolat memiliki serapan panjang gelombang maksimum sebesar 366,0 nm (pita I) dan 256,6 nm (pita II). Serapan yang terjadi pada panjang gelombang maksimum pita II disebabkan oleh adanya transisi elektronik dari n – π* yang menunjukkan keberadaan gugus kromofor tunggal seperti ikatan C=O. Sedangkan serapan yang terjadi pada panjang gelombang maksimum pita I disebabkan oleh adanya eksitasi elektron dari π – π* yang menunjukkan keberadaan gugus kromofor C=C terkonjugasi. Berdasarkan studi literatur, isolat kemungkinan termasuk ke dalam jenis flavonol atau khalkon (Dewi *et al*., 2017).

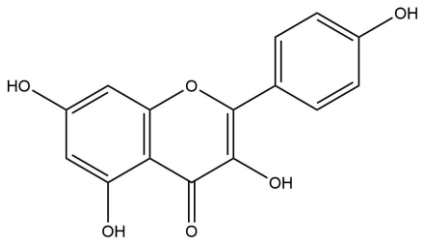
Pereaksi geser NaOH menyebabkan adanya pergeseran hipsokromik pada pita I sebesar -38,4 nm. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat gugus 7-OH. Kemungkinan ini diperkuat dengan pergeseran batokromik pada pita II sebesar +17,6 nm setelah ditambahkan pereaksi geser NaOAc, yang menunjukkan adanya gugus 7-OH. Setelah dibiarkan 5 menit, tidak terjadi penurunan intensitas. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat *o*-diOH pada cincin A atau B. Pereaksi geser NaOAc menyebabkan pergeseran pada pita II sebesar +17,6 nm dan terjadi pengurangan intensitas. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat gugus yang peka terhadap basa seperti gugus -OH pada C-6 C-7, C-7 C-8, atau C-3 C-4'. Pereaksi geser H_3BO_3 tidak memberikan hasil yang sesuai dengan literatur yang ada. Hal ini membuktikan bahwa tidak terdapat o-diOH di

cincin A yaitu pada C-6 C-7 atau C-7 C-8. Penambahan pereaksi geser $AlCl_3$/HCl menyebabkan adanya pergeseran pada pita II sebesar 13,2 nm. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan terdapat gugus 5-OH.

Tabel 6. Interpretasi Perubahan Panjang Gelombang Maksimum Isolat Flavonoid dengan Pereaksi Geser

Pelarut	Panjang gelombang maks		Pergeseran panjang gelombang maks		Dugaan Substitusi
	Pita I	Pita II	Pita I	Pita II	
Metanol	366,0	256,6	-	-	Flavonol (3 -OH bebas)
Metanol + NaOH	327,6	273,4	-38,4	+16,8	7 -OH
Metanol + NaOH 5 menit	324,8	273,4	-41,2	+16,8	Tidak terbukti ada o-diOH pada cincin A atau B
Metanol + NaOAc	334,0	274,2	-32,0	+17,6	7-OH. Gugus yang peka terhadap basa, -OH pada 6,7 atau 7,8 atau 3,4'.
Metanol + NaOAc + H_3BO_3	291,8	262,8	-74,2	+6,2	Tidak terbukti ada *o*-diOH pada cincin A (6,7 atau 7,8)
Metanol + $AlCl_3$	303,2	270,2	-62,8	+13,6	5-OH
Metanol + $AlCl_3$ + HCl	303,2	269,8	-62,8	+13,2	

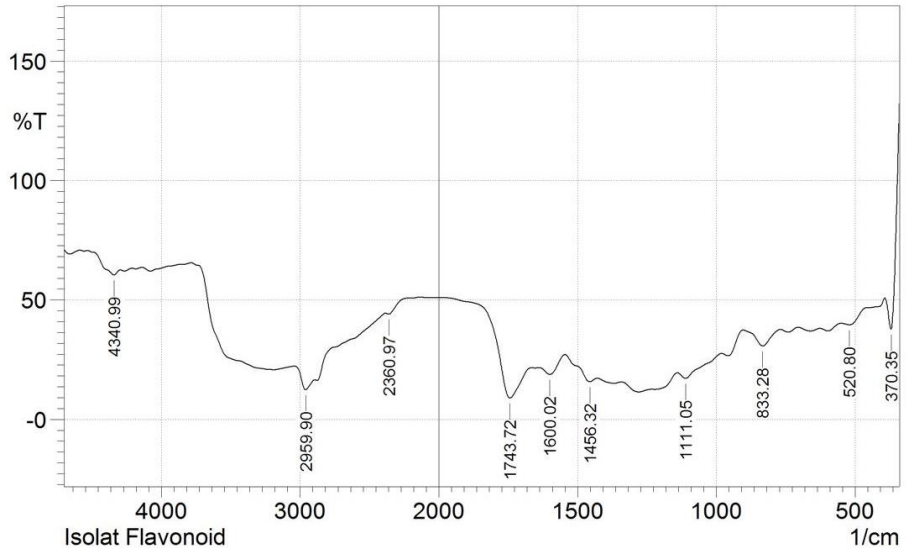
Berdasarkan interpretasi data perubahan panjang gelombang maksimum dengan pereaksi geser, kemungkinan senyawa flavonoid yang terdapat pada isolat termasuk golongan flavonol karena spektrum yang terbentuk merupakan ciri khas dari flavonol dengan kemungkinan terdapat gugus hidroksil pada C-3, C-5, C-7, dan C-4'. Senyawa flavonol dengan posisi gugus seperti yang diduga biasa disebut dengan kaempferol.



3,4',5,7-tetrahydroxy-2-phenylchromen-4-one

Gambar 5. Struktur Molekul Kaempferol

Pada identifikasi menggunakan FTIR, hasil spektogram FTIR pada sampel isolat flavonoid disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Hasil Spektrum FTIR Isolat Flavonoid

Spektra IR pada Gambar 6., terdapat serapan lebar antara bilangan gelombang 3200 – 3600 cm^{-1} yang menunjukkan keberadaan gugus –OH yang berasosiasi dengan fenol dan alkohol (Marcus dan Nwineewii, 2015). Serapan khas flavonoid lainnya juga terdapat pada 1743,72 cm^{-1} yang merupakan serapan gugus karbonil C=O alifatik dari keton atau ester alifatik dan 1600,02 cm^{-1}, 1456,32 cm^{-1} yang merupakan serapan khas C=C aromatik dari flavonoid. Serapan khas lainnya yaitu gugus C–O eter pada bilangan gelombang 1111,05 cm^{-1}. Hasil ini menandakan bahwa flavonoid kemungkinan termasuk ke dalam golongan flavonol dan bukan khalkon. Hal ini dikarenakan khalkon tidak memiliki jenis ikatan C–O eter pada strukturnya. Pernyataan ini mendukung kemungkinan bahwa senyawa dari isolat tersebut berasal dari golongan flavonol yaitu turunan kaempferol.

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol, fraksi n-butanol, dan isolat daun anggur Bali memiliki aktivitas antioksidan (IC_{50}) berturut-turut sebesar 88,94; 67,46; dan 52,07 ppm dan kadar flavonoid totalnya berturut-turut 9,24; 18,45; dan 35,71 mg*QE*/g. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi kemurnian atau konsentrasi senyawa flavonoid, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya. Kedua parameter memiliki koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9293 yang menunjukkan hubungan sangat kuat antara kadar flavonoid total dan aktivitas antioksidan. Senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol daun anggur Bali (fraksi A) berjenis flavonol dengan gugus –OH yang tersubstitusi pada atom C nomor 3, 5, 7, dan 4’ sehingga diduga merupakan senyawa atau turunan kaempferol.

DAFTAR PUSTAKA

Andriani, D. 2022. Uji Aktivitas dan Formulasi Serum Daun Anggur (Vitis vinifera L.) Sebagai Antioksidan. *Skripsi*. Program Studi Farmasi Universitas Bakti Tunas Husada. Tasikmalaya

BPOM. 2014. Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Badan Pengawas Obat dan Makanan RI. Jakarta

Dewi, N. W. R. K., Gunawan, I. W., Puspawati, N. M. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Antioksidan Golongan Flavonoid Dari Ekstrak Etil Asetat Daun Pranajiwa (*Euchresta horsfieldii* Lesch benn.). *Cakra Kimia Indonesia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*. 5(1): 27-34

Goufo, P., Singh, R. K., Cortez, I. 2020. A Reference List of Phenolic Compounds (Including Stilbenes) in Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Roots, Woods, Canes, Stems, and Leaves. *Antioxidants*. 9(398)

Insanu, M., Karimah, H., Pramastya, H., dan Fidrianny, I. 2021. Phytochemical Compounds and Pharmacological Activities of *Vitis vinifera* L.: An Updated Review. *Departemen Biologi Farmasi*. Bandung. 11(5):

13829-13849

Marcus, A. C., dan Nwineewii, J. D. 2015. Studies on the Crude Extract of Moringa Oleifera Leaf for Preliminary Identification of Some Phytochemicals and Organic Functions. *IOSR Journal of Applied Chemistry*. 8(12): 1-5

Moniharapon, P. J., Queljoe, E. D., Simbala, H. 2016. Identifikasi Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tauge (*Phaseolus radiatus* L.). *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. 5(4): 130-136

Mukhriani., Sugiarna, R., Farhan, N., Rusdi, M., dan Arsul, M.I. 2019. Kadar Fenolik dan Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Anggur (*Vitis vinifera* L.). *ad-Dawaa' J.Pharm.Sci*. 2(2): 95-102.

Murray, R. K., Granner, D.K., dan Rodwell, V.W. 2019. *Biokimia Harper*. a.b. Andri Hartono. Edisi 30. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta

Najmudin, G. A., Lukmayani, Y., Yuliawati, K. M. 2023. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper ornatum* N.E.Br.). *Bandung Conference Series: Pharmacy*. 3(2): 1-4

Noor, S. U., dan Gozali, A. 2018. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Teripang Emas (*Stichopus hermanni*) terhadap Aktivitas Antioksidan Nanoemulsi Minyak Biji Anggur (*Vitis vinifera*). *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 16(1): 36-41.

Nur'amala, P. 2019. Aktifitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Kecipir (Psophocarpus Tetragonolobus L) Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Pendidikan Biologi Fakultas Tarbiyah Dan Keguruan. Bandar Lampung

Oktavia, F. D., dan Sutoyo, S. Skrining Fitokimia, Kandungan Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Tumbuhan (*Selaginella doederleinii*). *J Kim Ris*. 6(2): 141-153

Parwata, I. M. O. A. 2016. *Flavonoid*. Universitas Udayana. Denpasar, Bali.

Putri, A. S. P., dan Hidajati, N. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Fenolik Ekstrak Methanol Kulit Batang Tumbuhan Nyiri Batu (*Xylocarpus moluccencis*). *Unesa Journal of chemistry.* 4(1): 37-42.

Safitri, E. R., Rohama, dan Vidiasari, P. 2020. Skrining fitokimia serta uji aktivitas antioksidan ekstrak bunga ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) dengan metode DPPH. *Journal of Pharmaceutical Care and Science*. 1(1): 10-18

Siswati. 2020. Analisa Kadar Air dan Kadar Abu pada Simplisia Temu Giring (*Curcumae heyneana*) dan Simplisia Kunyit (*Curcumae domestica*) di Balai Riset dan Standarisasi Industri Medan. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara. Medan

Treml, J., dan Smejkal, K. 2016. Flavonoids as Potent Scavengers of Hydroxyl Radicals. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15: 720-738

Vanessa, M., Munhoza, R. L., José R.P., João, A.C., Zequic, E., Leite, M., Gisely, C., Lopesa, J.P., Melloa. 2014. Extraction Of Flavonoids From Tagetes Patula: Process Optimization And Screening For Biological Activity. *Rev Bras Farmacogn*. 24: 576-583

Zubaidah E., Veronica, C. 2014. Studi Aktivitas Antioksidan Cuka Berbasis Buah Anggur Bali (*Vitis* vinifera) Utuh Tanpa Kulit. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. 8(2): 95-103

.