

KADAR TOTAL FLAVONOID DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI ETIL ASETAT DAUN GAHARU (*Gyrinops versteegii*)

I. M. O. A. Parwata^{1*}, I. N. A. Kusuma¹, I. G. A. K. S. P. Dewi¹

¹*Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana,
Jimbaran, Bali, Indonesia*

*Email: okaadiparwata@unud.ac.id

ABSTRAK

Antioksidan alami yang berasal dari kelompok senyawa flavonoid pada tumbuhan sebagai antioksidan alternatif terus meningkat penggunaan, pengembangan dan penelitiannya. Salah satu diantaranya adalah tanaman gaharu (*Gyrinops versteegii*), yang banyak dimanfaatkan dan dikembangkan sebagai obat tradisional, dimana senyawa yang diduga bertanggung jawab adalah golongan flavonoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kadar total flavonoid pada fraksi etil asetat daun gaharu dan aktivitasnya sebagai antioksidan. Penentuan kadar total flavonoid fraksi etil asetat daun gaharu ditentukan dengan cara mengukur nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 dengan kuersetin sebagai pembanding. Uji aktivitas antioksidan fraksi etilasetat daun gaharu dilakukan dengan cara mengukur aktivitas peredaman menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm terhadap radikal DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Sebanyak 100 gram serbuk kering daun gaharu yang dimaserasi dengan 2L aqua DM (70°C – 80°C) menghasilkan ekstrak pekat sebanyak 400 mL. Hasil partisi menggunakan pelarut etil asetat, kloroform dan heksanadiperoleh fraksi kental berturut-turut 8,27 gram, 4,05 gram, dan 5,58 gram. Analisis kualitatif dengan uji fitokimia menunjukkan fraksi etil asetat positif mengandung senyawa flavonoid dengan intensitas perubahan warnanya yang paling tinggi. Hasil penelitian menunjukkan kadar total flavonoid yang diperoleh dari fraksi etil asetat daun gaharu adalah 840,12 mg QE/100 gram dan IC₅₀ sebesar 60,40 ppm. Nilai ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) memiliki kadar total flavonoid yang tinggi dan mempunyai aktivitas antioksidan yang kuat.

Kata kunci: antioksidan, daun gaharu (*Gyrinops versteegii*), DPPH, IC₅₀.

ABSTRACT

Natural antioxidants derived from the group of flavonoid compounds in plants as alternative antioxidants continue to increase their use, development and research. One of them is agarwood (*Gyrinops versteegii*) that is widely used as a traditional medicine, where the substances that are thought to be responsible are flavonoid compounds. This study was conducted to determine the total flavonoid content in the ethyl acetate fraction of agarwood leaves and their antioxidant activities. The total flavonoid content was determined based on the absorbance value measured at a wavelength of 415 nm by using UV-Vis spectrophotometer, with a quercetin as standard for comparison. The antioxidant activity test of the ethylacetate fraction of *Gyrinops versteegii* leaves was carried out by measuring the scavenging activity of DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) using UV-Vis spectrophotometer at a wavelength of 517 nm. A total of 100 grams of dry agarwood leaf powder were macerated with 2L aqua DM (70°C – 80°C) and 400 mL of concentrated extract was obtained. The next partition with ethyl acetate, chloroform and hexane produced concentrated fractions of 8.27 grams, 4.05 grams and 5.58 grams, respectively. Qualitative analysis using phytochemical tests showed that the ethyl acetate fraction positively contained flavonoids with the highest intensity of color change. The results showed that the total flavonoid content obtained from the ethyl acetate fraction of agarwood leaves was 840.12 mg QE/100 grams and IC₅₀ 60.40 ppm. This value indicated that the ethyl acetate fraction of *Gyrinops versteegii* leaves had high levels of total flavonoids and strong antioxidant activity.

Keywords: agarwood (*Gyrinops versteegi*) leaves, antioxidants, DPPH, IC₅₀.

PENDAHULUAN

Keanekaragaman sumber daya alam menghasilkan keanekaragaman sumber senyawa kimia yang tidak terbatas jumlah maupun jenisnya. Keanekaragaman senyawa kimia (*chemodiversity*) yang dihasilkan dari keanekaragaman sumber alam hayati berperan aktif untuk menunjang kebutuhan hidup manusia seperti untuk obat-obatan, pembasmi hama, parfum, antibakteri dan sebagai bahan sintesis senyawa organik yang memiliki peran dan manfaat yang baik bagi manusia. Senyawa kimia yang aktif tersebut diantaranya senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid. Salah satu sumber senyawa aktif tersebut terdapat dalam tanaman gaharu (*Gyrinops versteegii*).

Tanaman gaharu (*Gyrinops versteegii*) mempunyai khasiat obat seperti asmaatik, anti mikroba, stimulant kerja saraf, obat sakit perut, penghilang rasa sakit, diare, tersedak, tumor usus, obat kanker dan sebagai antioksidan (Heyne, 1987). Keanekaragaman senyawa kimia pada tanaman gaharu juga terdapat pada kulit batang, resin (gubal), dan daunnya. Daun gaharu diduga berpotensi sebagai sumber aktif senyawa antioksidan, hal ini diperkuat dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Mega *et al.* (2010) dimana ekstrak metanol daun gaharu mengandung senyawa metabolit sekunder seperti senyawa fenol, terpenoid, dan flavonoid.

Senyawa antioksidan yang berasal dari tumbuh-tumbuhan umumnya merupakan kelompok senyawa fenol salah satu diantaranya adalah flavonoid (Vanessa *et al.*, 2014). Flavonoid merupakan suatu senyawa polifenol atau aromatik alam dengan 15 atom karbon pada inti dasarnya yang mampu menstabilkan radikal bebas yang ada di dalam tubuh. Secara umum kerangka dasar flavonoid bersifat polar karena memiliki gugus -OH yang bisa membentuk ikatan glikosid dengan gula sehingga larut dalam pelarut polar seperti air, metanol dan etanol, namun beberapa flavonoid bebas (aglikon) bersifat kurang polar sehingga larut dalam pelarut semi polar seperti kloroform, butanol dan etil asetat (Theodora, 2019).

Aktivitas antioksidan daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) terutama pada ekstrak airnya secara signifikan dapat menurunkan kadar MDA dan 8-OHdG serta menaikkan aktivitas SOD dan katalase pada tikus wistar yang diberi aktivitas fisik maksimal (Parwata *et al.*, 2018). Ekstrak air daun gaharu juga dapat menurunkan kadar glukosa darah pada tikus wistar yang

hiperglikemia (Parwata *et al.*, 2018).

Keberadaan senyawa flavonoid mempunyai bioaktivitas sebagai antioksidan dijadikan dasar dalam penelitian ini. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kadar total flavonoid dan potensinya sebagai antioksidan alam dengan mengukur peredaman terhadap radikal bebas DPPH.

MATERI DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gaharu (*Gyrinops versteegii*) diperoleh dari daerah Kelaci, Kecamatan Marga, Kabupaten Tabanan. Bahan kimia yang digunakan yaitu aqua DM, sodium hidroksida (NaOH) 10%, asam sulfat (H₂SO₄) pekat, aluminium klorida (AlCl₃), asam klorida (HCl) pekat, serbuk magnesium, aquades, standar kursetin, 2,2-diphenyl-1-picrylhidrazyl (DPPH) pelarut *pro analysis* (p.a) seperti etil asetat, n-heksana, kloroform dan etanol.

Peralatan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1800, neraca analitik, wadah maserasi, penguap putar vakum (*Vacuum Rotary Evaporator*), dan seperangkat alat gelas.

Cara Kerja

Ekstraksi sampel

Serbuk daun gaharu dengan kadar air 8,59% sebanyak 100 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut aqua DM yang dipanaskan pada suhu 70°C - 80°C. Maserasi dilakukan sebanyak empat kali yang menghasilkan filtrat berwarna merah kecoklatan sebanyak 2L. Filtrat selanjutnya diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak air pekat 400 mL. Ekstrak air pekat yang didapat dilanjutkan ke proses partisi menggunakan tiga pelarut yaitu heksana, kloroform, dan etil asetat.

Partisi

Ekstrak air pekat sebanyak 100 mL dipartisi menggunakan pelarut n-heksana terlebih dahulu sebanyak 50 mL dengan lima kali pengulangan. Ekstrak pekat air yang sudah dipartisi dengan heksana dipartisi lagi dengan menggunakan pelarut kloroform sebanyak 50 mL dengan empat kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi menggunakan kloroform dilanjutkan

menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 50 mL dengan lima kali pengulangan.

Partisi tersebut akan mendapatkan tiga fraksi yaitu fraksi heksana, fraksi kloroform dan fraksi etil asetat. Ketiga fraksi ini diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* sampai didapatkan fraksi kental heksana, kloroform dan etil asetat.

Uji fitokimia

Sebanyak 2 mL masing-masing larutan ekstrak dimasukkan dalam 3 tabung reaksi berbeda. Tabung reaksi pertama ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan sedikit serbuk magnesium, tabung reaksi kedua ditambahkan 3 tetes H₂SO₄ pekat dan dipanaskan selama 15 menit, dan pada tabung ketiga ditambahkan 3 tetes NaOH 10%. Perubahan warnaketika ditambahkan 3 tetes HCl pekat menjadi warna jingga, ketika ditambahkan 3 tetes H₂SO₄ kemudian dipanaskan 15 menit menjadi warna merah, dan ditambahkan 3 tetes NaOH 10%. Perubahan warna kuning-merah menunjukkan adanya kandungan flavonoid pada sampel.

Analisis kadar totalflavonoid

Kandungan flavonoid total pada masing-masing fraksi hasil partisi daun gaharu ditentukan menggunakan metode Almey *et al* (2010). Fraksi etil asetat, kloroform, N-heksana dan airditimbang masing-masing sebanyak 0,403 gram, 0,536 gram, 0,263 gram dan 0,233 gram. Ekstrak N-heksana, kloroform, etil asetat dan ekstrak air dilarutkan menggunakan etanol 50% ke dalam labu ukur 5 mL kemudian disaring. Hasil filtrat yang didapatkan direaksikan dengan AlCl₃ dengan perbandingan 1:1 dimana 250 µL filtrat dipipet dan ditambahkan sebanyak 250 µL etanol 50%. Filtrat tersebut dimasukkan pada tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan 500 µL AlCl₃. Filtrat yang sudah dicampur dengan AlCl₃ divortex hingga homogen dan diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 415 nm. Blanko terdiri atas pelarut yang digunakan tanpa disertai pembanding (kuersetin) atau sample ekstrak. Pembuatan kurva baku kuersetin dibuat dengan seri konsentrasi 1; 2; 4; 8; 16; 32 mg/L, kadar total flavonoid dinyatakan dalam mg *Quarsetin Equivalent* (QE) tiap 100 g berat ekstrak.

Pengujian aktivitas antioksidan

Sebanyak 10,2 mg sampel dilarutkan dalam metanol menggunakan labu ukur 0,5 mL

sampai tanda batas kemudian dikocok sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 20,4 mg/mL. Larutan induk sampel kemudian dipipet masing-masing 0,5 µL; 1 µL; 1,5 µL dan 2 µL dan dijadikan 500 µL dengan penambahan metanol.

Sebanyak 500 µL DPPH 0,1 mM (tanpa penambahan sampel) dimasukkan dalam kuvet, diinkubasi selama 30 menit Diukur absorbansi pada panjang gelombang 517 nm. Larutan sampel sebanyak 500 µL dimasukkan ke dalam kuvet, ditambahkan 500 µL DPPH 0,1 mM kemudian campuran didiamkan selama 30 menit dan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemampuan antioksidan diukur berdasarkan penurunan nilai absorbansi akibat adanya penambahan sampel. Persen peredaman dapat dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Abs. kontrol} - \text{Abs. sampel}}{\text{Abs. kontrol}} \times 100\% \quad (1)$$

Berdasarkan nilai % inhibisi yang diperoleh dibuat kurva terhadap konsentrasi larutan uji atau larutan pembanding. Sumbu x sebagai konsentrasi sampel dan % peredaman sebagai sumbu y, selanjutnya dibuat persamaan regresi liniernya. Didapat hasil dari persamaan regresi linier dapat dihitung nilai IC₅₀ dengan memasukkan nilai y sebesar 50, sehingga diperoleh nilai x sebagai IC₅₀ (Almey *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi simplisia

Hasil maserasi dari 100 g serbuk daun gaharu dipekatkan menjadi 400 mL ekstrak pekat berwarna merah kehitaman. Sebanyak 100 mL ekstrak air daun gaharu di partisi dengan menggunakan heksana, kloroform, dan etil asetat. Fraksi hasil partisi masing-masing diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental heksana 5,58 gram, kloroform 4,05 gram, dan etil asetat sebanyak 8,27 gram.

Uji fitokimia

Hasil uji fitokimia dengan pereaksi Sodium Hidroksida (NaOH) 10%, Bate smith-Metcalf dan Wilstater menghasilkan warna yang spesifik pada ketiga ekstrak yang diperoleh dimana pada fraksi n-heksana diperoleh warna coklat dengan pereaksi NaOH 10%, merah

dengan pereaksi Bate smith-Metcalf dan kuning kehijauan pada pereaksi wilstater . Pada fraksi kloroform diperoleh warna kuning dengan ketiga pereaksi. Sedangkan pada fraksi etil asetat yang diuji dengan NaOH 10% berwarna kuning orange, dengan pereaksi Bate smith-Metcalf berwarna kuning-oranye dan kuning-merah pada pereaksi Wilstater (Vilmakumar *et. al.*, 2014).

Analisis kadar total flavonoid

Hasil analisis flavonoid total dalam berbagai fraksi daun gaharu ditunjukkan pada Tabel 1. Fraksi etil asetat merupakan sampel uji yang memiliki kandungan flavonoid total per gram fraksi terbesar dibanding dengan sampel uji lainnya (Etika dan Iryani, 2019). Kadar total flavonoid ditentukan menggunakan kurva kalibrasi larutan standar. Kurva kalibrasi standar kuersetin dengan konsentrasi 0 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 32 ppm memiliki persamaan $y = 0,0483x + 0,0024$ (dengan nilai koefisien korelasi R^2 0,9998), dimana y menunjukkan absorbansi sedangkan x adalah konsentrasi. Selanjutnya, kadar total flavonoid dapat ditentukan dari persamaan kurva tersebut, dengan memasukkan absorbansi dari

masing-masing fraksi (sebagai nilai y) ke dalam persamaan, sehingga didapatkan kadar total flavonoid sebagai nilai x. Hasilnya didapat kadar flavonoid total untuk fraksi heksana sebesar 136,27mg QE/ 100 gram, kloroform 30,04mg QE/ 100 gram, dan fraksi etil asetat 840,12mg QE/ 100 gram.

Uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat daun gaharu (*Gyrinops versteegii*)

Hasil uji aktivitas antioksidan secara spektrofotometri UV-Vis dengan metode DPPH dari fraksi etil asetat didapatkan absorbansi yang terukur mengalami penurunan seiring dengan penambahan fraksi etil asetat kedalam larutan DPPH 0,1 mM. Hal ini sesuai dengan hasil yang didapatkan pada Tabel 2. Tereduksinya molekul DPPH oleh senyawa antioksidan dalam senyawa flavonoid menyebabkan terjadinya penurunan absorbansi karena absorbansi diukur pada panjang gelombang dari molekul DPPH sehingga dapat dikatakan fraksi etil asetat efektif dalam meredam radikal DPPH. Penurunan absorbansi juga diikuti dengan berkurangnya intensitas warna ungu dari larutan DPPH (Almey *et al.*, 2010).

Tabel 1. Hasil penentuan kadar senyawa flavonoid total dalam ekstrak daun gaharu

Fraksi	Kadar Total flavonoid (mg QE/ 100 gram)	Uji warna			Keterangan
		NaOH 10%	Bate smith-Metcalf	Wilstater	
Heksana	136,27	Coklat	Merah	Kuning kehijauan	++
Kloroform	30,04	Kuning	Kuning	Kuning	+
Etil asetat	840,12	Kuning-Orange	Kuning-oranye	Kuning-Merah	+++

Keterangan : +++ : Kandungan flavonoid paling tinggi (intensitas warna paling jelas)
 ++ :Kandungan flavonoid tinggi (intensitas warna jelas)
 + : Kandungan flavonoid rendah (intensitas warna kurang jelas)

Tabel 2. Hasil Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Daun Gaharu

Sampel	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi	%inhibisi	Persamaan regresi	IC ₅₀ (mg/L)
	0	0,529	0		
Isolat fraksi A	20,4	0,413	21,9	y = 0,74902x +	60,40
	40,8	0,306	42,2	4,76	
	61,2	0,263	50,3	R ² = 0,9818	
	81,2	0,2	62,2		

Kurva kalibrasi dari konsentrasi sampel memiliki persamaan $y = 0,74902x + 4,76$, dengan harga koefisien korelasi $R^2=0,9818$ sehingga didapatkan nilai IC₅₀ sebesar 60,40 mg/L. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak air fraksi etil asetat daun gaharu memiliki aktivitas antioksidan yang kuat (Jun, 2006 dalam Anisa, 2018).

SIMPULAN

Kadar total flavonoid pada fraksi etil asetat sebesar 840,12 (mg QE/100 g) dan nilai IC₅₀ yang diperoleh 60,40 mg/L. Hal ini membuktikan bahwa fraksi etil asetat daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) memiliki kadar total flavonoid yang tinggi dan aktivitas antioksidan yang kuat sehingga dapat dikembangkan sebagai antioksidan alternatif yang berasal dari alam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Koordinator Program Studi Kimia FMIPA Udayana, Kepala Laboratorium UPT Ilmu Pangan, Kepala Laboratorium Forensik MABES POLRI Cabang Denpasar yang telah memberikan fasilitas untuk pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Almey, A. A. A., Khan, C. A. J., Zahir, S., Suleiman, K. M., Aisyah. R. M., Rahim, K. K. 2010. Total phenolic content and primary antioksidan activity of methanolic and ethanolic extract of aromatic plants' leaves. *Int. Food Res. J.* 17: 1077-1088.
- Chang, C., Yang, M., Wen, H., and Chern, J. 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J. Food and Drug Analysis.* 10(3): 178-182.
- Etika, B. S., Iryani. 2019. Isolation and Characterization of Flavonoids from Black Glutinous Rice (*Oryza sativa* L. Var Glutinosa). *EKSATA: Berkala Ilmiah Bidang MIPA.* 20(2): 6-16.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Volume II, Yayasan Sarana Wana Jaya: Diedarkan oleh Koperasi Karyawan. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Mega, I. M., Swastini D. A. 2010. Screening Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Metanol Batang Gaharu (*Gyrinops versteegii*). *J. Kimia.* 4(2). Program Studi Kimia. FMIPA. Universitas Udayana.
- Parwata, I. M. O. A., Laksmiwati, A. A. I. A. M., Sudiarta, I W., Dina, M. N., Yasa, I W. P. S. 2018. The Contents of Phenol and Flavonoid Compounds in Water Extract of *Gyrinops versteegii* Leaves have Potentially as Natural Antioxidants and Hypoglycemic in Hyperglycemic. *Biomedical and Pharmacology Journal.* 11(3): 1543-1552.
- Parwata, I. M. O. A., Manuaba, I. B. P., Sutirtayasa, I. W. P. 2018. Gaharu Leaf Water Extract Reduce MDA and 8-OHdG Levels and Increase Activities SOD and Catalase in Wistar Rats Provided Maximum Physical Activity. *Bali Medical Journal.* 5(3): 79-83.
- Parwata, I. M. O. A., Manuaba, I. B. P., Sutirtayasa, I. W. P. 2018. The Potency of Flavonoid Compounds in water Extract *Gyrinops Versteegii* Leaves as Natural Antioxidants Sources. *Biomedical & Pharmacology Journal.* 11(3): 1501-151.
- Tenggulun (*Protium Javanicum* Burm. F.) Terhadap Ulat Kubis *Plutella Xylostella*. *Jurnal Media Sains* 2(2): 90-95.
- Theodora, C. T., Gunawan I W. G., Swantara, I. M. D. 2019. Isolasi Dan Identifikasi Golongan Flavonoid Pada Ekstrak Etil

- Asetat Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.). *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*. 3(2): 131-138.
- 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.
- Vilmakumar, C. S., Hosagaudar, V. B., Suja, S. R., Vilash, V., Krishnakumar, N. M., Latha, P. G. 2014. Comparative preliminary phytochemical analysis of ethanolic extracts of leaves of *Olea dioica* Roxb., infected with the rust fungus *Zaghouania oleae* (E.J. Butler) Cummins and non-infected plants. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 3(4): 69-72.