

KADAR TOTAL FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN FRAKSI n-HEKSANA DAUN GAHARU (*Gyrinops versteegii*)

I M. O. A. Parwata*, N. M. D. Devanthi, I G. A. K. S. P. Dewi

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

*Email: okaadiparwata@unud.ac.id

ABSTRAK

Penggunaan obat herbal sebagai antioksidan kian meningkat. Salah satu diantaranya ialah daun gaharu (*Gyrinops versteegii*). Tanaman gaharu telah banyak dimanfaatkan oleh masyarakat untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Masyarakat Papua telah memanfaatkan akar, kulit, dan daun dari gaharu sebagai obat malaria dan perawatan kulit. Studi ini bertujuan untuk memperoleh data mengenai kandungan flavonoid total dan kapasitas antioksidan dari fraksi n-Heksana daun gaharu (*Gyrinops versteegii*). Sebanyak 100 g serbuk kering daun gaharu dengan kadar air 8,59% dimaserasi dengan etanol 96% dan diperoleh 10 g ekstrak pekat melalui evaporasi dengan vacuum rotary evaporator. Ekstrak ini dilanjutkan ke tahap partisi memakai pelarut n-heksana, kloroform dan etil asetat. Hasil yang diperoleh ialah ekstrak kental berturut-turut 5,66 g n-heksana, 2,23 g kloroform, 0,85 g etil asetat dan 1,14 g ekstrak air sisa. Skrining fitokimia menunjukkan ekstrak n-heksana positif memiliki kandungan flavonoid dengan kadar total flavonoid tertinggi 1557,66 mg QE/100 g. Pemeriksaan aktivitas antioksidan fraksi n-Heksana secara *in-vitro* memanfaatkan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) menunjukkan nilai IC₅₀ sebesar 126,76 ppm. Hasil ini menyatakan bahwa fraksi n-Heksana dari ekstrak daun gaharu memiliki kadar total flavonoid yang tinggi dan mengandung senyawa aktif antioksidan berkapasitas sedang.

Kata kunci: stres oksidatif, flavonoid, fraksi n-Heksana, DPPH dan antioksidan

ABSTRACT

The use of herbal medicines as antioxidants has increased recently. One of them is *gaharu* leaf (*Gyrinops versteegii*). *Gaharu* plants have been widely used by people to treat various types of diseases. Papuan people have used the roots, bark and leaves of *gaharu* as malaria medicine and skin treatment. This research intended to ascertain the total content of flavonoids and antioxidant capacity of the n-hexane fraction in *gaharu* leaves' extract. A total amount of 100 g dry powders of *gaharu* leaves, with water content of 8.59%, macerated with 96% ethanol, resulted in 10 g of concentrated extract obtained by evaporation using vacuum rotary evaporator. This extract then proceeded to the fractionation stage using solvents such as n-hexane, chloroform and ethyl acetate. The results obtained were 5.66 g of n-hexane, 2.23 g of chloroform, 0.85 g of ethyl acetate and 1.14 g of the remaining water extract. Phytochemical screening showed that the n-hexane extract positively contained flavonoids with the highest total flavonoid contents of 1557.66 mg QE/100 g. In-vitro test for the antioxidant activity of the n-hexane fraction utilizing the procedure of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) showed the IC₅₀ value of 126.76 ppm. These results indicate that the n-Hexane fraction of *gaharu* leaves' extract has a high total flavonoid contents and consists of active antioxidant compounds with medium capacity.

Keywords: oxidative stress, flavonoids, fraction n-Hexane, DPPH and antioxidant

PENDAHULUAN

Pemanfaatan tanaman untuk bahan obat, seperti jamu, obat herbal terstandarisasi (OHT), dan fitofarmaka dalam mengatasi masalah kesehatan kian meningkat. Gerakan ini dimotivasi dengan adanya perubahan gaya hidup dan perkembangan pola penyakit yang

dialami masyarakat. Salah satu bentuk pemanfaatannya adalah dalam mengatasi stress oksidatif yang diakibatkan antioksidan endogen tidak mampu menetralsisir radikal bebas dalam tubuh. Penggunaan tanaman obat sebagai antioksidan saat ini terus meningkat, terutama dengan memanfaatkan daun gaharu (*Gyrinops versteegii*).

Daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) dapat bermanfaat secara efektif sebagai sumber senyawa antioksidan alami karena berdasarkan beberapa studi menyatakan bahwa daun gaharu memiliki senyawa fenol, terpenoid dan flavonoid yang merupakan metabolit sekunder di dalamnya (Mega, 2010). Flavonoid dapat berperan sebagai antioksidan karena kemampuannya untuk menyediakan hidrogen radikal untuk radikal bebas. Peredaman senyawa radikal bebas oleh ekstrak etanol daun gaharu memperkuat dugaan bahwa dengan konsentrasi yang tinggi dapat meningkatkan kapasitasnya sebagai antioksidan (Silaban, 2014).

Ekstrak air daun gaharu mempunyai aktivitas antioksidan secara *in-vivo* karena dapat secara signifikan meningkatkan aktivitas enzim SOD dan Katalase serta menurunkan secara signifikan *Malondialdehyde* (MDA) dan *8-Hydroxydeoxyguanosine* (8-OHdG). Aktivitas ini diduga disebabkan kandungan flavonoidnya yang tinggi (Parwata *et al.*, 2016). Kandungan kimia pada tanaman gaharu berpotensi sebagai senyawa antioksidan karena memiliki nilai $IC_{50}=3,44$ mg/mL untuk ekstrak air, ekstrak metanol dengan nilai $IC_{50}=16,55$ mg/mL, ekstrak etil asetat dengan nilai $IC_{50}=19,20$ mg/mL dan nilai $IC_{50}=23,45$ mg/mL untuk ekstrak etanol (Parwata *et al.*, 2018). Ekstrak air dari daun gaharu secara signifikan dapat mereduksi kandungan gula darah pada tikus jenis wistar yang mengalami peningkatan gula darah (Parwata *et al.*, 2018).

Flavonoid merupakan suatu senyawa polifenol atau aromatik alam dengan 15 atom karbon pada inti dasarnya. Adanya substituen -OH pada cincin A dan B mampu menetralkan kelebihan radikal bebas di dalam tubuh. Jumlah substituen -OH yang terikat pada cincin A maupun B akan mempengaruhi kelarutan dari flavonoid. Adanya gugus -OH bisa membentuk ikatan O-glikosida dengan molekul gula seperti ribosa, glukosa dan lain-lain sehingga dapat larut dalam pelarut dengan polaritas yang tinggi. Beberapa flavonoid bebas (aglikon) bersifat kurang polar seperti flavonol larut dalam pelarut yang polaritasnya lebih rendah dari pelarut polar seperti kloroform, butanol dan etil asetat (Theodora, 2019). Semakin sedikit jumlah -OH yang terikat menyebabkan flavonoid larut dalam pelarut dengan polaritas yang rendah seperti n-heksana. Beberapa flavonoid flavon dan flavanon larut dalam n-heksana seperti 5-hidroksi-7-metoksi-flavanon

(Parwata *et al.*, 2016).

Penggunaan daun gaharu jenis *Gyrinops versteegii* sebagai obat antioksidan alami belum banyak dikenal oleh masyarakat dan penelitian terkait zat aktif flavonoid yang ada dalam daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) belum banyak dilakukan di Indonesia. Berlatar belakang hal tersebut, peneliti ingin meneliti lebih lanjut kadar total flavonoid fraksi n-heksana ekstrak daun gaharu serta aktivitas antioksidannya.

MATERI DAN METODE

Bahan

Serbuk daun gaharu, akuades, asam klorida 37% (E Merck), asam sulfat (H_2SO_4) 96% (E Merck), natrium hidroksida (E Merck), serbuk Mg, Kuersetin (Sigma-Aldrich), etanol 96% teknis (Brataco), DPPH (Sigma-Aldrich), pelarut *pro analysis* seperti kloroform, etil asetat, n-heksana, metanol dan etanol (E Merck)

Alat

Seperangkat alat gelas, *vortex mixer*, timbangan analitik, *vacuum rotary evaporator*, wadah maserasi, *filler*, dan spektrofotometer *Ultraviolet-Visible* 1800 Shimadzu *double beam*.

Cara Kerja

Ekstraksi simplisia

Sebanyak 100 g serbuk daun gaharu dengan kadar air sebesar 8,59% dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% teknis sebanyak 5 liter (5 x 1 L). Maserasi berlangsung selama 5x24 jam sambil sesekali dilakukan pengadukan. Filtrat akan didapatkan melalui penyaringan hasil maserasi. Filtrat yang dihasilkan dikumpulkan dan selanjutnya dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* menggunakan suhu $60^{\circ}C$ dan kecepatan putaran 100 rpm sampai didapatkan ekstrak kental etanol daun gaharu. Ekstrak kental ini dilarutkan dalam campuran etanol : air (7:3) dan diuapkan kembali untuk memperoleh ekstrak air.

Partisi

Ekstrak air sebanyak 150 mL dipartisi menggunakan pelarut n-heksana terlebih dahulu sebanyak 40 mL dengan delapan belas kali pengulangan. Ekstrak air yang sudah dipartisi dengan n-heksana dipartisi lagi dengan

menggunakan pelarut kloroform sebanyak 40 mL dengan delapan kali pengulangan. Ekstrak hasil partisi menggunakan kloroform dilanjutkan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 40 mL dengan lima kali pengulangan. Pengulangan ini dilakukan hingga ekstrak dalam pelarut berwarna bening yang menandakan bahwa pelarut telah berhasil melarutkan seluruh komponen dalam ekstrak. Lapisan air sisa dari partisi ini juga dikumpulkan.

Partisi tersebut akan menghasilkan empat fraksi yakni n-heksana (fraksi non polar), kloroform (fraksi semi polar), etil asetat (fraksi semi polar), dan air (fraksi polar) yang dimana ekstrak kental dari keempat fraksi akan diperoleh dengan menguapkan keempat fraksi ini dengan alat evaporator putar vakum.

Uji fitokimia

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

Analisis Kadar Total Flavonoid

Kandungan flavonoid total pada masing-masing fraksi hasil partisi daun gaharu ditentukan menggunakan metode Almey *et al* (2010). Ekstrak kental n-heksana, kloroform, etil asetat dan air berturut-turut diambil sebanyak 0,182 g, 0,458 g, 0,496 g dan 0,445 g. Masing-masing ekstrak lalu dimasukkan ke dalam labu takar, diencerkan dengan etanol 50% hingga 5 mL dan filtrasi. Filtrat yang didapat diberi AlCl₃ dengan mengambil 250 µL ekstrak dan 250 µL etanol 50% yang direaksikan, campuran ini dipindahkan ke dalam *test tube* lalu diberi larutan AlCl₃ sebanyak 500 µL. Larutan lalu dihomogenisasi dan distabilkan reaksinya sekitar tiga puluh menit. Absorbansi diperiksa pada $\lambda = 415$ nm dan pengolahan kurva standarisasi kuersetin dibuat dengan seri konsentrasi 0; 4; 8; 12; 16; 20 mg/L, kandungan flavonoid total diketahui

dengan satuan mg ekvalen kuersetin tiap 100 g berat ekstrak.

Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pemeriksaan aktivitas antioksidan dilakukan dengan mengikuti prosedur Almey *et al*. (2010). Analisis diawali dengan melarutkan sebanyak 0,01 g isolat fraksi n-heksana dalam 5 mL etanol 96% yang kemudian dibuat seri pengenceran larutan uji dengan mengambil fraksi sebanyak 0; 25; 50; 75; 100 µL yang selanjutnya dilarutkan hingga volume 500 µL dengan metanol p.a.

Kelima larutan uji tersebut ditambahkan 500 µL larutan DPPH 0,1 mM, kemudian distabilkan reaksinya dengan waktu minimal tiga puluh menit. Pemeriksaan absorbansi dilakukan pada $\lambda = 517$ nm. Kemampuan antioksidan dapat dilihat dari hasil % inhibisi dan IC₅₀. Nilai % inhibisi dapat dihitung menggunakan persamaan berikut:

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

(Cheng and Prusoff, 1973)

Berdasarkan nilai % peredaman yang didapat, kurva linier hubungan konsentrasi larutan uji dengan % peredaman diolah, dimana sumbu x merupakan konsentrasi dan % peredaman sebagai sumbu y, selanjutnya dibuat persamaan regresi liniernya. Dari persamaan regresi linier nilai IC₅₀ dapat dihitung dengan mensubstitusi nilai y menjadi angka 50, dan nilai x akan diperoleh yang merupakan IC₅₀ (Almey *et al.*, 2010).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi simplisia

Maserasi selama 5x24 jam menghasilkan 10 g ekstrak pekat etanol berwarna hijau dan ekstrak pekat ini dilarutkan dalam campuran 500 mL etanol:air (7:3) sehingga diperoleh 150 mL ekstrak air berwarna hijau pekat yang ketika dipisahkan secara ekstraksi cair-cair dengan n-heksana, kloroform, dan etil asetat mendapatkan 5,66 g ekstrak pekat n-heksana, 2,23 g ekstrak pekat kloroform, 0,85 g ekstrak pekat etil asetat, dan 1,14 g ekstrak pekat air sisa setelah diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator*.

Analisis kadar Total Flavonoid

Kadar total flavonoid dimulai dengan pengukuran absorbansi larutan standar Kuersetin dalam variasi konsentrasi (0, 4, 8, 12, 16, dan 20 mg/L). Berdasarkan nilai absorbansi yang diperoleh, dapat dibuat kurva standar Kuersetin dengan persamaan garis linier: $y = 0,0415x - 0,0056$ dengan koefisien regresi linier sebesar 0,9987.

Dari persamaan garis linier $y = 0,0415x - 0,0056$ dapat diperoleh konsentrasi masing-masing fraksi yang diplot pada sumbu-y. Hasil perhitungan kadar total flavonoid keempat fraksi dipaparkan oleh Tabel 1.

Uji Aktivitas Antioksidan

Pengukuran aktivitas antioksidan isolat murni dilakukan secara spektrofotometri menggunakan metode DPPH. Aktivitas antioksidan ditentukan dengan memakai parameter IC_{50} , yang dimana merupakan konsentrasi ekstrak yang dapat menetralkan sebanyak 50% radikal bebas (Dungir *et al.*, 2012). Pengujian aktivitas antioksidan ini dilakukan dengan membuat beberapa variasi konsentrasi dari fraksi n-heksana dan

absorbansinya diukur pada panjang gelombang 517 nm (Cheng and Prusoff, 1973).

Reaksi yang terjadi antara larutan uji dengan DPPH ditunjukkan dengan perubahan warna ungu dari larutan DPPH yang menjadi kuning (Prayoga, 2013). Meskipun tidak semua larutan uji mengalami perubahan warna menjadi kuning setelah direaksikan, namun saat pengukuran absorbansinya terjadi penurunan absorbansi DPPH (Gandjar dan Rohman, 2007). Hal ini selaras dengan data yang didapatkan pada Tabel 2. Penurunan absorbansi diakibatkan adanya reduksi molekul DPPH oleh senyawa antioksidan dalam senyawa flavonoid (Almey *et al.*, 2010).

Kurva linier dari hubungan konsentrasi sampel dan % inhibisi memiliki persamaan $y = 0,3548x + 5,026$, dengan harga koefisien korelasi $R^2 = 0,9671$ sehingga diperoleh nilai IC_{50} dari isolat adalah sebesar 126,76 ppm yang menurut Tristantini *et al.* (2016) merupakan senyawa antioksidan dengan kapasitas sedang, karena semakin kecil nilai IC_{50} suatu senyawa maka senyawa tersebut semakin efektif sebagai penangkal radikal bebas (Rohman, 2005).

Tabel 1. Hasil Penentuan Kandungan Senyawa Flavonoid Total Dalam Ekstrak Daun Gaharu

Fraksi	Kadar Total flavonoid (mgQE/100g)	Uji warna			Keterangan
		NaOH 10%	Bate smith-Metcalfe	Wilstater	
n-Heksana	1557,66	Kuning	Kuning	Kuning kecoklatan	+++
Kloroform	12,23	Jingga	Kuning kecoklatan	Coklat kekuningan	-
Etil asetat	219,34	Jingga-merah	Kuning	Hijau kekuningan	+
Air	1287,66	Merah pekat	Jingga	Jingga kekuningan	++

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 Pengukuran Kapasitas Antioksidan Fraksi n-Heksana Daun Gaharu

Sampel	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi	% inhibisi	Persamaan regresi	IC_{50} (mg/L)
	0	0,597	0		
Isolat fraksi	50	0,423	29,15	$y = 0,3548x + 5,026$	126,76
	100	0,366	38,69	$R^2 = 0,9671$	
F4	150	0,222	62,81		
	200	0,168	71,86		

SIMPULAN

Kadar total flavonoid pada fraksi n-Heksana ekstrak daun gaharu sebesar 1557,66 mg QE/100g, dan nilai IC₅₀ yang diperoleh sebesar 126,76 ppm. Hal ini membuktikan bahwa fraksi n-Heksana daun gaharu (*Gyrinops versteegii*) memiliki kadar total flavonoid yang tinggi dan aktivitas antioksidan yang sedang sehingga dapat dikembangkan sebagai antioksidan alternatif yang berasal dari alam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Dihaturkan ucapan terima kasih 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., Khan, A. J., Zahir, S., Suleiman M., Aisyah R. K. 2010. Total Phenolic Content and Primary Antioxidant Activity of Methanolic and Ethanolic Extract of Aromatic Plants' Leaves. *Int. Food Res. J.* 17: 1077-1088.
- Cheng, Y., Prusoff, W. H. 1973. Relationship Between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Percent Inhibition (IC₅₀) of an Enzymatic Reaction, *Biochem. Pharmacol.* 22.
- Dungir, S. G. Dewa, G., Katja, K., Vanda S. K. 2012. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Bubuk Simplisia Kulit Manggis (*Gascinia mangostana* L.). *Jurnal Mipa Unsrat.* 1(1): 11-15.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Mega, I. M. dan Swastini, D. A. 2010. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antiradikal Bebas Ekstrak Metanol Daun Gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Jurnal Kimia.* 4(2): 187-192.
- Parwata, I. M. O. A., Sukardiman., Mulya, H. S., Alit, W. 2016. Inhibition of Fibrosarcoma Growth by 5-hydroxy-7-methoxy-flavanons from *Kaempferia pandurata* Roxb. *Biomed. Pharmacol. J.* 9(3): 941-94.
- Parwata, I. M. O. A., Manuaba, I. B. P., Surtayasa, I. W. P., Wita, I. W. 2016. Gaharu Leaf Water Extract Reduce MDA and 8-OHdG Levels and Increase Activities of SOD and Catalase in Wistar Rats Provided Maximum Physical Activity. *Bali Med J.* 5(3): 79-83.
- Parwata, . M. O. A., Manuaba, P., Yasa, S. 2018. The Potency of Flavonoid Compounds in water Extract *Gyrinops versteegii* Leaves as Natural Antioxidants Sources. *Biomed. Pharmacol. J.* 11(3): 1501-1511.
- Parwata, I. M. O. A., Laksmiwati., Sudiarta., Dina, M. N., Sutirta Yasa. 2018. The Contents of Phenol and Flavonoid Compounds in Water Extract of *Gyrinops versteegii* Leaves have Potential as Natural Antioxidants and Hypoglycemic in Hyperglycemic. *Biomed. Pharmacol. J.* 11(3): 1543-1552.
- Prayoga G. 2013. Fraksinasi, Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia dari Ekstrak Teraktif Daun Sambang Darah (*Excoecaria cochinchinensis* L.). *Skripsi*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Rohman, A. 2005. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *J. Agritech.* 25(3): 131-136.
- Silaban. 2014. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk) *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- 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).* 13(2): 131-138.
- Tristantini, D., Ismawati, A., Pradana, B. T., Jonathan, J. G. 2016. Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode DPPH pada Daun Tanjung (*Mimosa elengi* L.). *Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia*. Yogyakarta.