

**Kadar Flavonoid Dan
Antioksidan Ekstrak Etanol
Dan Fraksi Batang Beluntas
(*Pluchea indica* Less.) Metode
ABTS⁺**

Noka Riyani¹⁾, Danang Raharjo²⁾,
Desy Ayu Irma Permatasari³⁾
¹⁾²⁾³⁾Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas
Duta Bangsa Indonesia

ABSTRAK

*Antioksidan adalah suatu substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang dapat disebabkan oleh radikal bebas terhadap sel-sel normal, antioksidan mempunyai kemampuan mendonorkan elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Beluntas (*Pluchea indica* Less.) merupakan tanaman yang memiliki kandungan antioksidan karena ditemukan berbagai macam metabolit sekunder, seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, sterol, fenol, dan saponin. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kadar flavonoid, metabolit sekunder dan aktivitas antioksidan pada ekstrak dan fraksi batang beluntas (*Pluchea indica* Less.). Pengukuran Aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan metode ABTS⁺ karena dapat digunakan pada kadar pH yang berbeda sehingga dapat larut dengan baik dalam pelarut organik maupun air. Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil kadar flavonoid ekstrak batang beluntas (*Pluchea indica* L.) yang diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis sebesar 11,211 mgQE/g. Ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* L.) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin*

serta tidak mengandung senyawa steroid /triterpenoid. Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air batang beluntas memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ berturut turut yaitu 100,380; 104,932; 14,051 dan 22,769 µg/ml. Berdasarkan tabel aktivitas antioksidan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat karena kurang dari 50 ppm.

Kata kunci: *Antioksidan, Batang Beluntas, Fraksi, IC₅₀, Kadar Flavonoid, Metode ABTS⁺.*

ABSTRACT

*Antioxidants are substances needed by the body to neutralize free radicals and prevent the damage that free radicals can cause to normal cells, antioxidants have the ability to donate electrons to stabilize free radicals. Beluntas (*Pluchea indica* Less.) is a plant that contains antioxidants because various secondary metabolites are found, such as alkaloids, phenolics, flavonoids, tannins, sterols, phenols, and saponins. The purpose of this study was to determine levels of flavonoids, secondary metabolites and antioxidant activity. on extracts and fractions of beluntas (*Pluchea indica* Less.) stems. Measurement of antioxidant activity was carried out using the ABTS⁺ method because it can be used at different pH levels so that it can dissolve well in organic solvents and water. From the research that has been done, it was found that the flavonoid content of the extract of the beluntas stem (*Pluchea indica* L.) which was tested using a UV-Vis spectrophotometer was 11,211 mgQE/g. The ethanol extract*

of the beluntas stem (*Pluchea indica* L.) contains flavonoid compounds, alkaloids, tannins and saponins and does not contain steroid/triterpenoid compounds. Ethanol extract, n-hexane fraction, ethyl acetate fraction, and ethanol-water fraction of beluntas stems had antioxidant activity with IC_{50} of 100,380, respectively; 104,932; 14,051 and 22,769 g/ml. Based on the table of antioxidant activity, the ethyl acetate fraction is included in the category of very strong antioxidant because it is less than 50 ppm.

PENDAHULUAN

Antioksidan merupakan suatu substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang dapat disebabkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein, lemak. Antioksidan mempunyai kemampuan mendonorkan elektron untuk menstabilkan radikal bebas. Antioksidan dapat diproduksi di dalam maupun luar tubuh (Hery, 2007). Sumber antioksidan alami banyak berasal dari buah, sayuran, atau tanaman lain yang mengandung vitamin A, C, antosianin, senyawa fenol, dan flavonoid (Tremel and Šmejkal, 2016). Senyawa metabolit yang memiliki potensi sebagai antioksidan alami adalah flavonoid (Sayuti and Yennina, 2015).

Indonesia kaya akan sumber daya alam yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber antioksidan alami, salah satunya adalah beluntas (*Pluchea indica* Less.) yang merupakan tumbuhan perdu yang berasal dari famili Asteraceae yang dapat tumbuh secara liar didaerah kemarau pada tanah yang keras dan berbatu atau ditanam menjadi

tumbuhan pagar. Beluntas memiliki kandungan antioksidan karena ditemukan berbagai macam metabolit sekunder, seperti alkaloid, fenolik, flavonoid, tanin, sterol, fenol, dan saponin serta memiliki potensi farmakologis sebagai agen analgesik (Widyawati *et al.*, 2018).

Aktivitas antioksidan metode ABTS⁺ dapat digunakan pada kadar pH yang berbeda. Sensitif terhadap pH asam, ABTS⁺ dapat larut dengan baik dalam pelarut organik maupun air, sehingga memungkinkan pendeteksian senyawa lipofilik dan hidrofilik (Shalaby and Shanab, 2013).

Berdasarkan uraian di atas, mendorong peneliti untuk mengkaji lebih lanjut mengenai potensi antioksidan dari ekstrak etanol dan tiga fraksi batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan metode ABTS⁺. Selain itu juga menetapkan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol *Pluchea indica* Less.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan kadar flavonoid dan uji antioksidan ekstrak etanol serta fraksinasi Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.) menggunakan metode ABTS⁺ (2,2-azino-bis(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic-acid) menggunakan alat Spektrofotometer UV-Visible.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Prodi S1 Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Duta Bangsa Surakarta. Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari-Juli 2022. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium

Biologi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.

Alat dan Bahan

Spektrofotometer UV Vis (*Shimadzu UV mini-1240*), Moisture Balance (*Ohaus MB 120*), Rotary Evaporator (*IKA HB 10 basic*), Timbangan Analitik (*Ohaus EP 214 sensitivitas 0,1 mg*), Corong Pisah (*Pyrex*), Gelas Ukur (*Pyrex*), Labu Ukur (*Pyrex*), Pipet Volume (*Pyrex*), Pengayak 40 Mesh, Pipet Tetes, Cawan Porselin, Tabung Reaksi, Batang Pengaduk, Gelas Beaker (*Pyrex*), Chamber (*CAMAG*), Plat KLT Silika Gel GF 254 (*Merck*), Pipa Kapiler 5 μ l (*CAMAG*), Sinar UV 365 Nm (*CAMAG*) dan Glassware. Serbuk batang beluntas (*Pluchea indica* Less.), Etanol 70% (*Teknis*), N-Heksan (*Teknis*), Etil Asetat (*Teknis*), Metanol P.A (*Pro Analisis*), Akuades, Kuersetin (*Sigma Aldrich*), $AlCl_3$ (*Teknis*), Natrium Asetat (*Teknis*), Reagen ABTS (*Sigma Aldrich*®), PBS (*Phosfat Buffer Saline*), $K_2S_2O_8$ (*Kalium Persulfat*), Serbuk Magnesium Timbal (III) Asetat, HCL (*Teknis*).

Ekstraksi Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

Sebanyak 200 gram serbuk batang beluntas diekstraksi dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70 % selama 3x24 jam dengan beberapa kali pengadukan, kemudian saring dengan corong buchner. Ampas di remaserasi sebanyak 1 kali selama 24 jam. Maserat yang dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40 – 60 °C. Filtrat diupkan diatas *waterbath* dan didapatkan ekstrak kental.

Fraksinasi Ekstrak Etanol Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

Ekstrak kental sebanyak 10 g ekstrak dilarutkan dengan aquades sebanyak 100 mL etanol, kemudian dimasukkan dalam corong pisah. Fraksinasi pertama dengan penambahan n-heksana sebanyak 100 mL kemudian digojog dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan aquadest di bawah dan lapisan n-heksana di atas) ambil lapisan n-heksana (replikasi 3 kali). Fraksinasi selanjutnya dilakukan dengan penambahan etil asetat sebanyak 100 mL ke dalam lapisan kemudian digojog dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan (lapisan aquadest di bawah dan lapisan etil asetat di atas) ambil lapisan n-heksana (replikasi 3 kali). Fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi n-heksana selanjutnya dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan dipekatkan di atas *waterbath* (Maravirnadita, 2019).

Penetapan Kadar Flavonoid

a. Penentuan panjang gelombang maksimum

Larutan kuersetin konsentrasi 20 ppm dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 0,2 mL $AlCl_3$ 10%, dan 0,2 mL natrium asetat 1 M, selanjutnya diukur serapannya pada rentang panjang gelombang 400-500 nm. Panjang gelombang yang menunjukkan nilai serapan tertinggi merupakan panjang gelombang maksimum (Kisuma, 2012).

b. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan kuersetin konsentrasi 20 ppm dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 0,2 mL $AlCl_3$ 10%, dan 0,2 mL natrium asetat 1 M, selanjutnya diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. *Operating time*

(OT) tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil (Kisuma, 2012).

c. Pembuatan Kurva Baku Kuersetin

Dibuat beberapa konsentrasi yaitu 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm dan 10 ppm. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuersetin dipipet 1 mL. Kemudian ditambahkan 0,2 mL $AlCl_3$ 10% dan 0,2 mL natrium asetat 1 M. Sampel diinkubasi selama *operating time*. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang maksimum (Winahyu *et al.*, 2019).

d. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Sebanyak 10 mg sampel dilarutkan dalam 10 mL metanol p.a, sehingga diperoleh konsentrasi 1000 ppm. Dari larutan tersebut dipipet 1 mL kemudian ditambahkan 0,2 mL larutan $AlCl_3$ 10% dan 0,2 mL natrium asetat 1 M. Sampel diinkubasi selama waktu *operating time* pada suhu kamar. Ukur pada panjang gelombang maksimum (Winahyu *et al.*, 2019).

Kadar flavonoid dihitung dengan persamaan regresi linier kurva baku kuersetin dimana konsentrasi sebagai sumbu x dan absorbansi sebagai sumbu y. Hasil absorbansi dari pengukuran sampel dimasukkan ke dalam regresi linier. Absorbansi sampel sebagai y, sehingga kadar flavonoid total yang diperoleh dinyatakan sebagai jumlah mg ekuivalen kuersetin (QE) pada tiap gram sampel (Winahyu *et al.*, 2019).

Pengukuran Antioksidan Metode ABTS(2,2-Azinobis 3-ethyl benzothiazoline 6- sulfonic acid)

a. Larutan radikal ABTS^{•+}

Larutan ABTS sebanyak 5 mL ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24 °C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan ABTS^{•+} dengan warna biru gelap (Pulungan, 2018).

b. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum

Larutan radikal ABTS^{•+} dipipet sebanyak 1 mL dan dicukupkan dengan buffer phospat pH 7,4 dalam labu ukur 25 mL. Absorbansi larutan diukur pada rentang panjang gelombang 700-750 nm, ditentukan panjang gelombang saat diperoleh serapan tertinggi (Pulungan, 2018).

c. Penentuan *Operating Time* (OT)

Larutan baku kuersetin 20 ppm, dipipet sebanyak 0,05 mL larutan ditambah 1 mL larutan radikal ABTS^{•+} diukur pada panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh absorbansi stabil. *Operating time* (OT) tercapai pada waktu dihasilkan absorbansi yang stabil (Faisal, 2019).

d. Pengukuran Serapan Larutan Blanko ABTS^{•+}

Larutan ABTS sebanyak 5 mL ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap suhu 22-24°C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan ABTS dengan warna biru gelap. Larutan ini kemudian diukur dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Pulungan, 2018).

e. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Baku Pemanding Kuersetin

Larutan baku kuersetin dibuat dari larutan intermediet 100 ppm dengan deret konsentrasi 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 0,8 mL; 1 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas (Pulungan, 2018). Masing - masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,1 mL larutan baku ditambah 2 mL larutan radikal ABTS^{•+}; larutan diinkubasi selama 2 menit yang diperoleh dan diukur serapan dengan Spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 734 nm (Faisal, 2019).

f. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Sampel (Ekstrak Etanol, Fraksi Air, Fraksi Etil Asetat, Dan Fraksi n-Heksana Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.))

Larutan stok sampel 1000 ppm dibuat dengan menimbang seksama sebanyak 50 mg sampel uji (Fraksi Etil asetat, Fraksi n-Heksan, Ekstrak etanol, dan Fraksi air Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)) kemudian masing-masing dilarutkan menggunakan metanol p.a hingga 50 mL. Larutan intermediet 100 ppm dengan deret konsentrasi 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm, 20 ppm dan 25 ppm atau dipipet masing-masing sebanyak 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL; 2,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan metanol p.a sampai tanda batas (Damanik, 2019). Masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,05 mL larutan

dan ditambah 1 mL larutan radikal ABTS^{•+}, larutan selanjutnya diinkubasi selama 2 menit dan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum, dilakukan replikasi 3 kali (Faisal, 2019). Pada penelitian yang telah dilakukan didapatkan panjang gelombang maksimum 740 nm.

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{abs kontrol} - \text{abs sampel}}{\text{abs kontrol}} \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ dihitung menggunakan rumus persamaan regresi linier antara konsentrasi versus % penghambatan. Nilai IC₅₀ didapatkan dari nilai x setelah mengganti y = 50

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.) dilakukan di Laboratorium Biologi Universitas Ahmad Dahlan. Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran dari sampel Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.) yang akan digunakan untuk penelitian demi menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dan kemungkinan tercampurnya dengan tanaman yang lain. Hasil dari determinasi yang telah dilakukan diperoleh hasil bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.). Sampel selanjutnya dijadikan serbuk simplisia dan kemudian dilakukan standarisasi serbuk kadar air, kadar abu dan susut pengeringan. Hasil penetapan kadar air serbuk simplisia batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) diperoleh yaitu sebesar 0,35 (% b/b). Kadar air yang cukup rendah pada ekstrak membantu kondisi ekstrak tetap awet. Syarat kadar air suatu simplisia

adalah kurang dari 10 (% b/b) (Depkes, 2000). Kadar abu total dalam serbuk simplisia batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) adalah 1,52 %. Kadar abu serbuk simplisia batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) memenuhi persyaratan yang tercantum pada MMI karena didapatkan hasil tidak lebih dari 10% dan jumlah senyawa yang hilang pada saat proses pengeringan adalah sebesar 0,434 % dan telah memenuhi syarat susut pengeringan yaitu tidak lebih dari 11% (Depkes, 2000).

Sebanyak 200 gr serbuk batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 70% sebanyak 2000 mL. Metode maserasi dipilih karena prosesnya mudah dan tidak menggunakan suhu tinggi yang mungkin dapat merusak senyawa

kimia yang memiliki aktivitas antioksidan yang terdapat dalam simplisia batang beluntas (*Pluchea indica* Less.). Etanol 70% merupakan pelarut yang bersifat universal sehingga dapat melarutkan analit yang bersifat polar, semi polar dan non-polar. Hasil rendemen yang diperoleh dari proses maserasi adalah 6,571 %.

a. Skrining Fitokimia Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

Skrining fitokimia dilakukan menggunakan 2 metode yaitu metode tabung (kompleks warna) dan KLT. Metabolit sekunder yang diuji secara kualitatif ini antara lain alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, steroid/ triterpenoid. Hasil uji fitokimia ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan metode uji tabung (reagen) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1
Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

Senyawa	Pereaksi	Tanda Positif	Hasil Pengamatan	Kesimpulan
Alkaloid	Dragendorf	Adanya endapan oranye/merah coklat.	Adanya endapan oranye/merah coklat.	Positif
	Mayer	Adanya endapan putih/kuning.	Tidak terbentuk endapan putih/kuning	Negatif
Flavonoid	Mg + HCl pekat	Perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga	Terjadi perubahan warna menjadi merah jingga	Positif
Tanin	FeCl ₃ 5%	Terbentuk warna hijau gelap/biru	Terbentuk warna hijau gelap/biru kehitaman	Positif
Triterpenoid/ Steroid	Lieberman Buchard	Terbentuk cincin kecoklatan/violet (triterpenoid), cincin biru kehijauan (steroid)	Tidak terbentuknya cincin biru kehijauan dan kecoklatan/violet	Negatif

Saponin	Aquadest	Terbentuk busa stabil (busa setinggi 1 cm selama 10 menit)	Terbentuknya busa stabil	Positif
---------	----------	--	--------------------------	---------

Sumber: Data Primer Diolah, 2022

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan menggunakan metode uji tabung yang diperoleh, dapat diketahui bahwa senyawa fitokimia yang terkandung dalam batang beluntas tersebut meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tannin, dan hasil negatif pada senyawa steroid/terpenoid.

Pada uji alkaloid ekstrak prinsipnya yaitu reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iod dalam pereaksi dragendroff dan pereaksi mayer (Soerya dan Suryanti Venty, 2005). Pada hasil penelitian yang telah dilakukan tabung 1 dengan reagen mayer menghasilkan warna kuning orange tidak ada endapan, sedangkan pada tabung 2 dengan reagen dragendorff menghasilkan warna orange gelap terbentuk endapan berwarna jingga atau merah sehingga hasil positif sehingga batang beluntas positif mengandung alkaloid.

Pada identifikasi flavonoid ekstrak batang beluntas ditambahkan dengan asam klorida dan serbuk magnesium untuk mereduksi ikatan glikosida dengan flavonoid. Agar flavonoid dapat diidentifikasi, maka ikatan glikosida dengan flavonoid harus diputus dengan mereduksi ikatan tersebut yang mana hasil yang

didapatkan positif dengan terbentuknya warna kuning (Muthmainnah, 2019). Terbentuknya warna jingga atau kuning pada ekstrak batang beluntas menunjukkan hasil yang positif.

Pada uji saponin ekstrak batang beluntas dihasilkan positif karena terbentuk buih stabil setinggi 1 cm, timbulnya buih pada uji saponin menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan untuk membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi glukosa dan senyawa lainnya. Buih yang dihasilkan saponin tidak terpengaruh oleh asam klorida 2N sehingga penambahan larutan asam klorida 2N buih tetap stabil dan tidak hilang (Soerya dan Suryanti Venty, 2005).

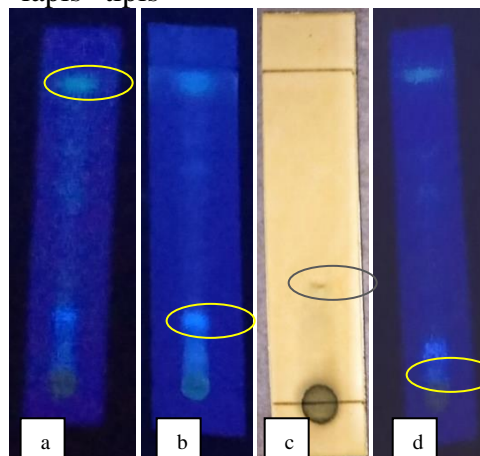
Pengujian golongan senyawa tanin dengan penambahan larutan $FeCl_3$ yang bertujuan untuk menentukan apakah sampel mengandung gugus fenol, adanya gugus fenol ini ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman atau biru tua setelah ditambahkan dengan reagen $FeCl_3$. Hal ini disebabkan tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} (Ergina dkk, 2014). Hasil pengujian pada ekstrak batang beluntas menunjukkan hasil positif mengandung senyawa tanin.

Pengujian senyawa triterpenoid dan steroid pada ekstrak batang beluntas menggunakan reagen Libermann-

Burchard (campuran antara asam sulfat dan asam anhidrida asetat). Senyawa triterpenoid akan mengalami dehidrasi saat penambahan asam kuat H₂SO₄ dan juga asam anhidrida asetat yang menyebabkan terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan dua pelarut. Hasil uji menunjukkan negatif mengandung senyawa triterpenoid ditandai dengan tidak terbentuknya cincin berwarna coklat pada ekstrak. Pada uji senyawa steroid menunjukkan hasil negatif karena tidak terbentuknya cincin berwarna hijau.

Skrining fitokimia dengan metode kromatografi lapis tipis

(KLT) dilakukan menggunakan fase diam plat Silika Gel GF 254 ukuran 1x5 cm yang telah diaktifasi dengan dipanaskan dengan oven suhu 100°C selama 10 menit. Fase gerak yang digunakan adalah n-heksana dan etil asetat dengan perbandingan (4:6). Dari hasil skrining fitokimia ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan metode uji kromatografi lapis tipis (KLT) didapatkan hasil ekstrak mengandung senyawa Flavonoid, Tanin, Alkaloid dan Steroid/Triterpanoid. Hasil skrining fitokimia metode KLT dapat dilihat pada gambar 1.



Sumber: Data Primer Diolah, 2022

Gambar 1

Hasil analisis Kromatografi Lapis Tipis, (a) Pengamatan senyawa Alkaloid pada sinar UV 366 nm, (b) Pengamatan senyawa Flavonoid pada sinar UV 366 nm, (c) Pengamatan senyawa Tanin pada sinar tampak, (d) Pengamatan senyawa Steroid/Triterpenoid pada sinar UV 366 nm.

Uji alkaloid yang dilakukan dengan pereaksi Dragendorff menunjukkan bercak coklat jingga berlatar belakang kuning. Timbulnya noda dengan Rf 0,95 berwarna kuning muda pada pengamatan dengan sinar tampak, berwarna hijau muda pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan

alkaloid pada ekstrak etanol batang beluntas (Saifudin, 2014).

Uji KLT flavonoid ekstrak batang beluntas dilakukan dengan reagen penampak noda sitroborat. Eluen ini menghasilkan spot noda dengan nilai Rf 0,375. Dari hasil KLT didapatkan bercak berwarna kuning kehijauan dan

berfluoresensi biru pada UV 366 nm yang diduga adalah senyawa golongan flavonoid (Saifudin, 2014).

Identifikasi senyawa tanin dengan nilai Rf 0,25 adalah senyawa tanin karena terdapat noda berwarna hitam setelah disemprot dengan FeCl₃ 5% dan diamati pada sinar tampak (Saifudin, 2014).

Pengujian senyawa Steroid/ triterpenoid dengan nilai Rf 0,225 merupakan senyawa steroid karena adanya noda berwarna hijau-biru setelah disemprot dengan pereaksi Liberman-Buchard. Hal ini menandakan bahwa sampel yang diuji positif mengandung steroid (Saifudin, 2014).

Berdasarkan hasil pengujian senyawa fitokimia ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan metode uji kromatografi lapis tipis (KLT), nilai Rf yang diperoleh berkisar antara 0,25-0,95 (Widyaratna, 2016). Nilai Rf memenuhi standar nilai yang baik yaitu berkisar 0,2-0,8. Senyawa dengan nilai Rf yang besar artinya memiliki kepolaran yang rendah begitu juga sebaliknya. Hal ini dikarenakan fase diam yang digunakan bersifat polar, sehingga senyawa yang lebih polar akan tertinggal pada fase diam (Rohman dan Gandjar, 2007).

b. Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

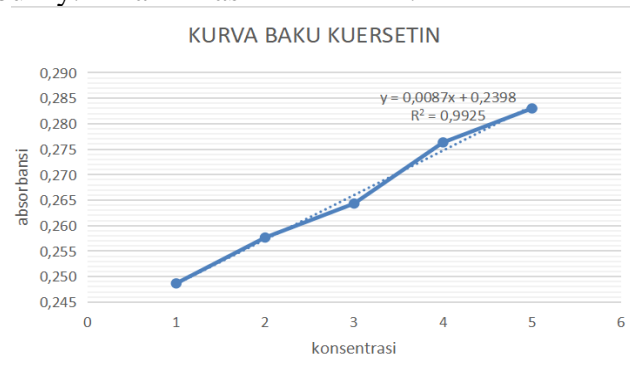
Penetapan kadar flavonoid total dalam ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dilakukan dengan metode kolorimetri. Prinsip dari metode

ini adalah pembentukan kompleks asam yang stabil antara AlCl₃ dengan gugus keton C-4 dan gugus hidroksil pada C-3 atau C-5 pada flavon dan flavonol. Sedangkan AlCl₃ membentuk ikatan yang labil dengan gugus orto dihidroksi di cincin A atau B pada flavonoid sehingga terbentuk warna yang dapat diukur dengan spektrofotometer UV/VIS. Sebagai standar baku digunakan quersetin karena quersetin termasuk flavonoid golongan flavonol. Penambahan natrium asetat untuk menstabilkan pembentukan kompleks antara AlCl₃ dan flavonoid (Patel, 2019). Dalam penetapan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) perlu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum, *operating time* dan pembuatan kurva baku quersetin yang akan digunakan dalam pengujian.

Dari hasil penetapan panjang gelombang maksimum dan *operating time* didapatkan panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebesar 440 nm memiliki absorbansi sebesar 0,431. Hal ini sesuai dengan penelitian (Dahlia dan Ahmad, 2014) dan *operating time* selama 10 menit untuk inkubasi. Dalam pembuatan kurva baku quersetin dilakukan pada panjang gelombang maksimum yaitu 440 dengan waktu inkubasi selama 10 menit. Dari penentuan kurva baku quersetin didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0087x + 0,2398$ dengan nilai korelasi $R^2 = 0,9925$ hasil persamaan regresi linear dapat dilihat pada gambar 2.

Penentuan kadar flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan memasukkan absorbansi yang dihasilkan ke dalam persamaan kurva kuersetin sebagai sumbu y. Dari hasil

pengukuran menunjukkan ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* Less.) mengandung flavonoid sebesar $11,211 \pm 0,239$ mg QE/g. Hasil pengukuran kadar flavonoid dapat dilihat dalam tabel 2.



Sumber: Data Primer Diolah, 2022

Gambar 2
Persamaan Kurva Baku Kuersetin

Tabel 2
Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Batang Beluntas (*Pluchea indica* Less.)

Sampel	Absorbansi rata-rata	Kadar Kuersetin (QE)	Rata-Rata \pm SD
Ekstrak Etanol Batang Beluntas (<i>Pluchea indica</i> Less.)	0,335	10,943	11,211 \pm 0,239
	0,338	11,287	
	0,339	11,402	

Sumber: Data Primer Diolah, 2022

c. Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode ABTS⁺

Penentuan aktivitas antioksidan dalam penelitian menggunakan metode ABTS. Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS adalah peredaman radikal bebas ABTS⁺ sehingga warna biru dari radikal bebas ABTS⁺ menghilang. Radikal bebas ABTS⁺ terjadi dari reaksi dari garam diammonium ABTS dengan kalium persulfat

yang menghasilkan warna biru (Shalaby and Shanab, 2013). Sebelum dilakukan pengukuran aktivitas antioksidan dengan metode ABTS perlu dilakukan penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time* yang akan digunakan dalam pengujian. Dari hasil penentuan panjang gelombang maksimum dan *operating time* didapatkan hasil panjang gelombang

maksimum 740 nm dengan *operating time* selama 24 menit.

Dari hasil pengujian aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* L.) memiliki sifat antioksidan sedang yang ditandai dengan nilai IC₅₀ sebesar sebesar 100,380 µg/mL, Fraksi n-heksan (non polar) sebesar 104,932 µg/mL tergolong sebagai antioksidan sedang, fraksi etanol air (polar) dan fraksi etil asetat (semi polar) batang beluntas (*Pluchea indica* L.) memiliki sifat antioksidan yang sangat kuat, hal

ini ditandai dengan nilai IC₅₀ yang diperoleh yaitu masing-masing sebesar 22,769 µg/mL dan 14,051 µg/mL. Nilai IC₅₀ kuersetin sebagai pembanding adalah 4,642 µg/mL (<50 µg/mL) sehingga tergolong sebagai antioksidan yang sangat kuat. Berdasarkan tabel kapasitas antioksidan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat yaitu < 50 ppm (Lung dan Destiani, 2017). Hasil pengukuran antioksidan dapat dilihat dalam tabel 3.

Tabel 3
Hasil pengukuran aktivitas antioksidan metode ABTS⁺⁺

Larutan Uji	Konsentrasi (ppm)	% Peredaman	IC ₅₀ (µg/mL)	Keterangan
Kuersetin Uji ABTS ⁺⁺	2	43,295	4,642	Sangat Kuat
	4	47,816		
	6	55,939		
	8	57,548		
	10	60,153		
Ekstrak Etanol	5	8,966	100,380	Sedang
	10	11,111		
	15	13,103		
	20	15,326		
	25	17,625		
Fraksi N-Heksan	5	12,490	104,932	Sedang
	10	14,100		
	15	16,858		
	20	17,548		
	25	20,153		
Fraksi Etil Asetat	5	4,981	14,051	Sangat Kuat
	10	15,862		
	15	36,782		
	20	52,644		
	25	58,697		
Fraksi Air	5	22,069	22,769	Sangat Kuat
	10	26,130		
	15	37,625		
	20	44,598		
	25	54,636		

Sumber: Data Primer Diolah, 2022

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan yaitu Ekstrak etanol batang beluntas (*Pluchea indica* L.) mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin. Kadar flavonoid ekstrak batang beluntas (*Pluchea indica* L.) yang diuji menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan 11,211 mg QE/g. Ekstrak etanol, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi etanol-air batang beluntas memiliki aktivitas antioksidan dengan IC₅₀ berturut turut 100,380; 104,932; 14,051 dan 22,769 µg/ml. Berdasarkan tabel kapasitas antioksidan fraksi etil asetat termasuk dalam kategori antioksidan yang sangat kuat yaitu < 50 ppm.

PUSTAKA ACUAN

- Dahlia, A. A. and Ahmad, A. R. (2014). Penetapan kadar flavonoid total dari ekstrak etanolik daun benalu mangga (*dendrophthoe pentandra* l. miq), *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 1(1).
- Damanik, L. V. (2019). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol, Fraksi N-Heksan, Fraksi Kloroform Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less.) dengan Metode DPPH dan ABTS. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara.
- Ditjen, P. O. M. and Depkes, R. I. (2000). *Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat*, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia, pp. 7–11.
- Faisal, H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Buah Okra (*Abelmoschus esculentus* L . Moench) Dengan Metode DPPH (1 , 1- difenil-2-pikrilhidrazil) dan Metode ABTS, *Regional Development Industry & Health Science, Technology and Art of Life*, 2 (1), pp. 1–5.
- Hery, W. (2007). *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Penerbit Kanisius, Yogyakarta, 18.
- Kisuma, P. (2012). Penetapan kadar flavonoid total dan daya antioksidan dari ekstrak etanol buah pare (*momordica charantia* l). *Skripsi*. UIN Alauddin Makassar.
- Lung, J. K. S. and Destiani, D. P. (2017). Uji aktivitas antioksidan vitamin A, C, E dengan metode DPPH, *Farmaka*, 15(1), pp. 53–62.
- Maravirnadita, A. H. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan, Etil Asetat, Dan Air Dari Buah Belimbing Manis (*Averrhoa Carambola*) Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Universitas Ahmad Dahlan.
- Muthmainnah, B. (2019). Skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder dari ekstrak etanol buah delima (*Punica granatum* L.) dengan metode uji warna, *Media Farmasi*, 13(2), pp. 36–41.
- Pulungan, W. U. (2018). Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan, Etil Asetat dan Etanol Daun Mobe (*Artocarpus Lacucha Buch-Ham.*) dengan Metode Pemerangkapan ABTS. *Skripsi*. Universitas Sumatera Utara.
- Rohman, A. and Gandjar, I. G. (2007). *Kimia farmasi analisis*, Yogyakarta: Pustaka Pelajar, pp. 298–304.
- Saifudin, A. (2014). *Senyawa alam metabolit sekunder teori, konsep*,

- dan teknik pemurnian. Deepublish. 4(1).
- Sayuti, K. and Yenrina, R. (2015). *Antioksidan alami dan sintetik*. Padang. Universitas Adalas, 40.
- Shalaby, E. A. and Shanab, S. M. M. (2013). Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. *NISCAIR-CSIR, India*.
- Soerya, M. D. and Suryanti Venty, S. (2005) 'Skrining Fitokimia dan Analisis kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol', *Surakarta: Jurnal Biofarmasi*, 3(1), pp. 26–31.
- Treml, J. and Šmejkal, K. (2016) 'Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals', *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Wiley Online Library, 15(4), pp. 720–738.
- Widyaratna, A. (2016) Uji Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea indica* L.), Ciplukan (*Physalis angulata* L.) dan Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) Terhadap Sel T47D. *Skripsi*. Universitas Muhamadiyah Surakarta.
- Widyawati, P. S. *et al.* (2018) 'Aktivitas Antioksidan Minuman Daun Beluntas Teh Hitam (*Pluchea indica* Less-Camelia sinensis)', *Agritech*, 38(2), pp. 200–207.
- Winahyu, D. A., Retnaningsih, A. and Aprillia, M. (2019) 'Penetapan kadar flavonoid pada kulit batang kayu raru (*Cotylelobiummelanoxylo*nP) dengan metode spektrofotometri uv-vis', *Jurnal Analis Farmasi*,