

UJI TOTAL KANDUNGAN FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN KEMBANG BULAN (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray)

Lia Anggresani¹, Yuliawati², Eliza Desriyanti³
^{1,2,3} Program Studi Farmasi, STIKES Harapan Ibu, Jambi, Indonesia
anggresani@yahoo.com

Abstrak

Latar Belakang: Flavonoid merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan dimana antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam radikal bebas. Tumbuhan Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) adalah suatu tumbuhan yang memiliki kandungan senyawa flavonoid. Tujuan untuk mengetahui kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan pada ekstrak daun kembang bulan.

Metode: Penentuan kadar flavonoid total dinyatakan sebagai ekivalen dari kuersetin ($\mu\text{g/ml}$) dengan metode Spektrofotometer UV-Vis dan uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH.

Hasil: Hasil penelitian didapat bahwa kadar flavonoid total pada ekstrak daun kembang bulan adalah 0,00592667% dan pengujian aktivitas antioksidan memberikan nilai IC_{50} sebesar 145,67 $\mu\text{g/ml}$.

Kesimpulan: Ekstrak daun kembang bulan memiliki aktivitas antioksidan yang sedang dimana nilai IC_{50} berada pada range 101-250.

Kata Kunci : Flavonoid, Antioksidan, *Tithonia diversifolia*

Abstract

Background : Flavonoid is a compound that have the potency as an antioxidant which can reduce free radicals. Kembang bulan leaves (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) is a plant that contains flavonoid. This research is to know the total flavonoid content and antioxidant activity of the extract kembang bulan leaves.

Method : Determination of total flavonoid content using a UV-Vis spectrophotometer and antioxidant activity using DPPH method.

Results : total flavonoid content from the extracts kembang bulan leaves is 0,00529667% and antioxidant activity give an IC_{50} value is 145,67 $\mu\text{g/ml}$

Conclusion : The extracts of kembang bulan leaves have a medium activity as antioxidant.

Key words : Flavonoid, Antioxidant, *Tithonia diversifolia*

PENDAHULUAN

Indonesia kaya akan tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai tanaman obat salah satunya adalah tanaman Kembang Bulan. Kembang bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A.Gray) merupakan spesies tumbuhan yang termasuk dalam family Asteraceae. Tumbuhan ini secara empirik telah lama digunakan oleh masyarakat di Asia Selatan, Amerika Tengah dan Afrika digunakan untuk mengobati beberapamacam penyakit(1).

Tanaman kembang bulan berkhasiat sebagai obat diabetes, malaria dan penyakit infeksi lainnya(2). Kandungan kimia dari daun, kulit batang dan akar tumbuhan kembang bulan mengandung saponin, polifenol dan flavonoid.

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tak

dapat membentuk cincin ketiga(3). Kedudukan gugus hidroksi fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Sejumlah tanamanobat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi dan antikanker(4).

Antioksidan merupakan zat yang dapat menetralkan radikal bebas. Radikal bebas adalah senyawa kimia yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan, senyawa ini harus mencari electron lain sebagai pasangan (5). Pada penelitian ini digunakan metode DPPH untuk mengukur aktivitas antioksidan. Metode DPPH dipilih karena merupakan metode yang cepat, sederhana dan murah (6).

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah rotary evaporator, timbangan analitik, plat tetes, spatel, Erlenmeyer, tabung reaksi, seperangkat alat spektrofotometer UV-Vis, kertas saring, gelas kimia, vial, aluminium foil, batang pengaduk, corong, pipet tetes, pipet volume, kertas sarang dan labu ukur.

Bahan yang digunakan adalah daun kembang bulan, methanol p.a, etanol 70%, $AlCl_3$, DPPH, Vitamin C, $FeCl_3$, HCl, serbuk Mg, aquadest dan kuersetin sebagai baku pembandingan.

Prosedur Kerja

1. Pengambilan dan Penyiapan Sampel

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kembang bulan yang diambil dari daerah Kerinci Provinsi Jambi

2. Pembuatan Ekstrak Daun Kembang Bulan

Daun Kembang bulan dikeringanginkan sampai kering ± 7 hari pada suhu kamar terlindung dari cahaya dan dirajang kemudian dimaserasi dengan etanol 70% selama 3 hari sambil sesekali

diaduk kemudian disaring sari etanolnya, dipisahkan dari ampas, ulangi proses maserasi kembali sampai 3x pengulangan. Selanjutnya dilakukan pemekatan dengan menggunakan vacuum rotary evaporator dengan suhu 50-60°C sampai diperoleh ekstrak kental daun kembang bulan.

3. Pembuatan Larutan Induk Kuersetin

Larutan induk dibuat dengan menimbang 10 mg kuersetin, dicukupkan dengan etanol sampai 25 ml, sehingga konsentrasi larutan induk 400 $\mu\text{g/mL}$. Dari larutan induk dipipet sebanyak 0,65 mL diencerkan dengan etanol, add sampai 10 mL, sehingga konsentrasinya 26 $\mu\text{g/mL}$. Larutan tersebut diambil sebanyak 2 mL lalu ditambahkan 2 mL $AlCl_3$ 2% yang telah dilarutkan dalam etanol. Kemudian di kocok dan didiamkan selama 30 menit. Larutan tersebut diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-800 nm.

4. Pembuatan Kurva Kalibrasi Larutan Standar Kuersetin

Pembuatan kurva kalibrasi dengan kuersetin sebagai pembandingan. Pembuatan kurva kalibrasi dengan variasi konsentrasi 8, 10, 12, 14 dan 16 $\mu\text{g/mL}$. Ambil 2 mL dari masing-masing konsentrasi ditambahkan dengan 2 mL $AlCl_3$ 2% yang telah dilarutkan dengan etanol lalu kocok dan diamkan selama 30 menit. Diukur serapannya dengan sprektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang yang telah didapatkan sebelumnya.

5. Penentuan Kadar Flavanoid Total Ekstrak Kembang Bulan

Ekstrak kental yang diperoleh dari ekstraksi dilarutkan dalam aquadest. Lalu diambil 2 mL dari ekstrak tambahkan 2 mL $AlCl_3$ 2% yang telah dilarutkan dengan etanol, lalu dikocok dan didiamkan selama 30 menit. Absorbansi diukur pada panjang gelombang yang telah didapatkan sebelumnya. Perhitungan rata-rata tiga

kali pengukuran. Kadar flavonoid total dinyatakan sebagai ekuivalen dari kuersetin ($\mu\text{g/mL}$).

6. Penentuan Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

a. Pembuatan Reagen DPPH

DPPH (1,1 diphenil-2-pikrihidrazil) ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan methanol add hingga 100 mL sehingga diperoleh konsentrasi larutan DPPH 100 ($\mu\text{g/mL}$).

b. Penentuan Panjang Gelombang Maksimum DPPH

Dipipet sebanyak 35 mL larutan DPPH add dengan methanol 100 ml (konsentrasi $35\mu\text{g/mL}$). Setelah itu biarkan selama 30 menit ditempat gelap. Lalu ukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm

c. Pemeriksaan Aktivitas Antioksidan

Ekstrak sampel ditimbang 10 mg lalu add dengan aquadest hingga 25 mL (konsentrasi $400\mu\text{g/mL}$). Kemudian buat seri konsentrasi 10, 20, 30, 40 dan $50\mu\text{g/mL}$. Untuk penentuan aktivitas antioksidan masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 mL larutan sampel dan masukkan ke dalam vial, kemudian tambahkan 3,8 mL larutan DPPH $35\mu\text{g/mL}$. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit ditempat gelap dan terlindung dari cahaya, lalu serapan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum DPPH yang didapat sebelumnya. Perbandingan yang digunakan adalah vitamin C dengan perlakuan yang sama dengan sampel uji.

Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan persentase inhibisi serapan DPPH dengan menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100\%$$

Keterangan :

A1 = Absorban Kontrol

A2 = Absorban Sampel (DPPH + sampel)

Aktivitas antioksidan dapat dilihat dari nilai IC_{50} yaitu konsentrasi larutan sampel yang memberikan inhibisi sebesar 50% terhadap radikal DPPH. Nilai IC_{50} diperoleh dari persamaan regresi :

$$Y = a + bx$$

Dimana : Y = % inhibisi

X = konsentrasi larutan sampel

HASIL

Hasil ekstraksi daun kembang bulan $33,874\text{g}$ didapatkan rendemennya $5,645\%$. Proses ekstraksi sampel dilakukan dengan cara maserasi dengan menggunakan pelarut etanol. Proses maserasi dilakukan karena tidak membutuhkan waktu yang lama.

Hasil uji skrining flavonoid dari ekstrak daun kembang bulan menunjukkan positif adanya flavonoid dengan terbentuknya warna merah pada penambahan serbuk Mg, etanol dan HCl.

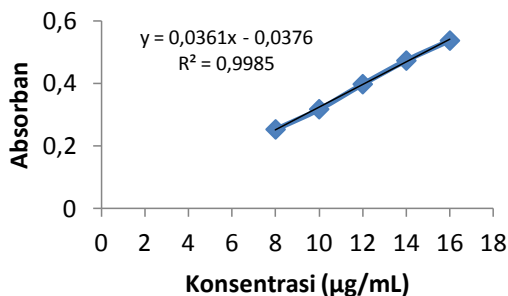
Analisis kandungan total flavonoid dilakukan untuk mengetahui seberapa besar kandungan flavonoid yang terdapat pada ekstrak daun kembang bulan. Penentuan kandungan total flavonoid dinyatakan sebagai kuersetin mg/mL . Pengukuran panjang gelombang maksimum kuersetin dengan pereaksi geser AlCl_3 didapatkan panjang gelombang $438,5\text{ nm}$. Setelah diperoleh panjang gelombang dari kuersetin, kemudian dilakukan pembuatan kurva kalibrasi dengan seri pengenceran (8, 10, 12, 14, dan $16\mu\text{g/mL}$) dan diukur pada panjang gelombang maksimum $438,5\text{ nm}$. Sehingga didapatkan hasil persamaan regresi yaitu $Y = 0,036x - 0,037$ dan $r = 0,998$ (Tabel 1) (Gambar 1).

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan sebanyak tiga kali pengukuran absorban sampel, dan kandungan flavonoid

dinyatakan dengan kesetaraan baku pembanding kuersetin dan didapatkan kandungan flavonoid total pada daun kembang bulan adalah 0,00592667%.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Absorbansi Standar Kuersetin

Konsentrasi (µg/mL)	Absorbansi (λ = 438,5 nm)
8	0,25348
10	0,31793
12	0,39793
14	0,47329
16	0,53712



Gambar 1. Kurva Kalibrasi Standar Kuersetin

Adanya kandungan flavonoid pada daun kembang bulan memberikan potensi aktivitas antioksidan. Semakin besar kandungan flavonoid pada suatu tanaman maka semakin tinggi aktivitas antioksidannya. Uji aktivitas antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan metode DPPH.

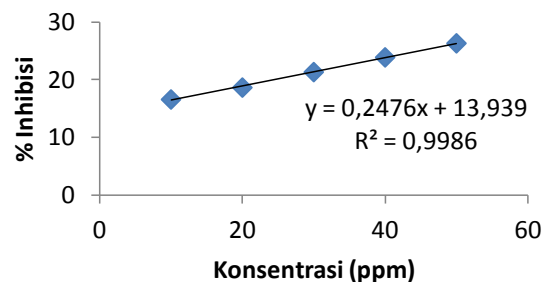
Pada pengujian aktivitas antioksidan digunakan larutan DPPH dengan konsentrasi 35 µg/mL. Didapatkan hasil serapan maksimum pada panjang gelombang 515,5 nm dengan absorbansi 0,820. Panjang gelombang ini digunakan untuk pengukuran aktivitas antioksidan larutan sampel. Larutan sampel diukur dengan seri konsentrasi (10, 20, 30, 40, dan 50 µg/mL) dan vitamin C digunakan sebagai pembanding kemudian diukur absorbansi dan persen inhibisi.

Persen inhibisi adalah kemampuan suatu sampel untuk menghambat aktivitas

radikal bebas yang berhubungan dengan konsentrasi suatu sampel. Persen inhibisi didapatkan dari perbedaan serapan antara absorbansi kontrol negatif dengan sampel yang diukur dengan spektrofotometri UV-Vis. Dari hasil pengukuran sampel dengan beberapa konsentrasi didapatkan persen inhibisi (Tabel 2) dan persamaan regresinya $Y = 0,247x + 13,93$ (Gambar 2).

Tabel 2. Hasil Pengukuran Absorbansi Sampel dan % Inhibisi Sampel

Konsentrasi (ppm)	Absorban (Sampel + DPPH)	Rata 2 Abs	% Inhibisi (Y)	IC ₅₀ (ppm)
X				
10	1. 0,6843	0,684	16,5853	145,67
	2. 0,6835			
	3. 0,6834			
20	1. 0,66737	0,667	18,6585	145,67
	2. 0,66669			
	3. 0,66724			
30	1. 0,64394	0,645	21,3414	145,67
	2. 0,64458			
	3. 0,66724			
40	1. 0,62309	0,624	23,9024	145,67
	2. 0,62299			
	3. 0,62500			
50	1. 0,60544	0,604	26,3414	145,67
	2. 0,60390			
	3. 0,60428			



Gambar 2. Kurva %Inhibisi Sampel Kembang Bulan

Dari hasil IC₅₀ memiliki nilai kurang dari 150 ppm. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Jun et al yang mengklasifikasikan tingkat kekuatan antioksidan menggunakan metode uji DPPH dapat dilihat pada tabel 3.

Sedangkan % inhibisi pada Vitamin C terlihat pada tabel 4 dengan persamaan regresi $Y = 0,242x + 32,37$. Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah Inhibition Concentration

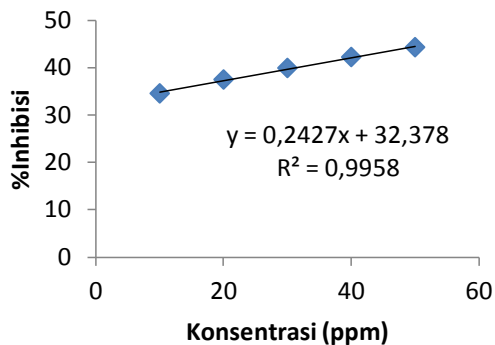
(IC₅₀) dimana semakin kecil nilai IC₅₀ berarti aktivitas antioksidannya semakin tinggi.

Tabel 3. Tingkat kekuatan antioksidan (7)

Intensitas	IC ₅₀
Sangat Aktif	< 50 ppm
Aktif	50-100 ppm
Sedang	101-250 ppm
Lemah	250-500 ppm

Tabel 4. Hasil Pengukuran Absorbansi Nilai % inhibisi Vitamin C

Konsentrasi (ppm)	Absorban (Sampel + DPPH)	Rata 2 Abs	% Inhibisi (Y)	IC ₅₀ (ppm)
10	1. 0,52374	0,537	34,5121	72,629
	2. 0,53456			
	3. 0,55324			
20	1. 0,52676	0,513	37,4390	72,629
	2. 0,50656			
	3. 0,50517			
30	1. 0,49290	0,493	39,8780	72,629
	2. 0,49290			
	3. 0,49565			
40	1. 0,47189	0,474	42,1951	72,629
	2. 0,47208			
	3. 0,47917			
50	1. 0,45746	0,457	44,2682	72,629
	2. 0,45648			
	3. 0,45715			



Gambar 3. Kurva Inhibisi Vit C

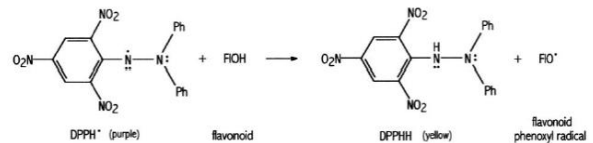
PEMBAHASAN

Ekstraksi sampel dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruang. Pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Etanol digunakan sebagai pelarut dengan kemampuan

ekstraksi yang tinggi untuk hampir semua senyawa bahan alam.

Penentuan kadar flavonoid dilakukan dengan metode spektrofotometri UV-Vis. Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat ditentukan dengan penambahan pereaksi geser ke dalam larutan.

Pada penelitian ini menggunakan pereaksi geser AlCl₃. Pereaksi ini dapat membentuk kompleks antara gugus keton pada atom C-4 dan juga dengan gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-4 yang bertetangga dari flavon dan flavonol. Dimana dasar penentuan kadar flavonoid secara spektrofotometri adalah adanya kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan AlCl₃ yang membentuk warna kuning. Berikut reaksi DPPH dengan flavonoid membentuk warna kuning dan radikal flavonoid (8)



Gambar 4. Reaksi DPPH dengan flavonoid membentuk warna kuning

Antioksidan dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Usaha pencarian antioksidan alami terus dilakukan untuk menggantikan antioksidan sintetis yang masih diragukan tingkat keamanannya (9).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jumlah kadar flavonoid total ekstrak daun kembang bulan adalah 0,00592667% dan memiliki aktivitas antioksidan yang sedang dengan IC₅₀ adalah 145,67 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. Wahyuni M, Saleh C, Kartika R, Bahan A. Uji Toksisitas (Brine Shrimp Lethality Test) Dan Uji

- Aktivitas Antibakteri Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* A . Gray) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *J Kim Mulawarman*. 2015;12:79–82.
2. Zirconia, Aisyah ; Kurniasih, Nunung dan Amalia V. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Daun Kembang Bulan (*Tithonia Diversifolia*) Dengan Metode Pereaksi Geser. *al Kim*. 2015;2(Juni):9–17.
 3. Markham, K.H. 1988. Cara, 2). MF (Edisi, I. PKP dan, ITB. SBP. No Title.
 4. Artanti, Nina ; Ma'arifa, Yelli ; Hanafi M. Isolation and Identification of Active Antioxidant Compound from Star Fruit (*Averrhoa carambola*) Mistletoe (*Dendrophthoe pentandra* (L.) Miq.) Ethanol Extract. ISSN 1812-5654; 2006. p. 1659–63.
 5. Hernani. Tanaman Berkhasiat Antioksidan. Synergy Media Books; 2006. 114 p.
 6. Prakash A, Rigelhof F, Miller E. Antioxidant Activity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011;15(4):376–8.
 7. Jun M, Fu H-Y, Hong J, Wan X, Yang CS, Ho C-T. Comparison of Antioxidant Activities of Isoflavones from Kudzu Root (*Pueraria lobata* Ohwi). *J Food Sci*. 2003;68(6):2117–2122.
 8. Dragan Ami}, a,* Du{anka Davidovi}-Ami}, a Drago Be{lo a and NT. structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat Chem ACTA*. 2002;67(18):2058–70.
 9. Ilkay Orhan, Murat Kartal, Mahmoud Abu-Asaker, F. Sezer Şenol, Gülderen Yilmaz BŞ. Free radical scavenging properties and phenolic characterization of some edible plants. *Food Chem*. 2009;Volume 114(Issue 1) : 276-281.