

PENETAPAN KADAR FENOLIK TOTAL, FLAVONOID TOTAL, DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK DAUN BENALU PETAI (*Scurrula atropurpurea* Dans.) BESERTA PENAPISAN FITOKIMIA

Fayakun

Prodi S1 Farmasi, STIKES Muhammadiyah Pekajangan Pekalongan

Email: fayakun.farm@gmail.com

ABSTRACT

*The free radicals are atoms or molecules that have unpaired electrons. While anti-oxidants are electron donor compounds that are able to capture foreign compounds that are free radicals. Plants in the world of health can be used as one of the effective natural material therapeutic approaches for the treatment of various diseases. Therefore researchers need to find plants that have anti-oxidant power. One of the plants to be studied is petai parasite leaves (*Scurrula atropurpurea* Dans.). The purpose of this study was to determine the levels of total phenolic compounds, total flavonoids, and anti-oxidant activity test extract of petai parasite leaves. The method used for the determination of total phenolic is the folin-ciocalteu method, determining total flavonoid levels with $AlCl_3$ colorimetric method, and testing antioxidant activity by DPPH free radical capture method. The results of the antioxidant activity test were expressed by IC_{50} which is the concentration value of petai parasite leaf extract which resulted in the capture of 50% radical DPPH. The results showed that petai parasitic leaf extract had a total phenolic content of $198,083 \pm 1,443$ mg GAE/g extract, total flavonoid was $144,6 \pm 4,444$ mg QE/g extract, and antioxidant activity test was 23.48 ± 0.036 μ g/mL. The IC_{50} value is included in the category of very strong antioxidant activity.*

Keywords : *Petai parasite leaves, total phenolic, total flavonoids, antioxidant, DPPH*

1. PENDAHULUAN

Radikal bebas merupakan atom atau molekul yang memiliki elektron yang tidak berpasangan. Radikal bebas itu sendiri memiliki dua sifat yang reaktivitasnya tinggi, karena kecenderungan dapat menarik elektron dan dapat mengubah suatu molekul untuk menjadi radikal yang baru sehingga terjadi reaksi rantai. Reaksi rantai tersebut akan berhenti apabila radikal bebas dapat diredam oleh suatu senyawa yang memiliki sifat sebagai antioksidan (Suryohudoyo, 1993).

Sebagian besar penyakit diawali dan disebabkan oleh adanya reaksi radikal bebas yang berlebihan didalam tubuh. Oleh karena adanya pengaruh radikal bebas yang tidak baik bagi kesehatan tubuh, maka tubuh memerlukan suatu komponen penting yang menangkal

serangan radikal bebas. Komponen penting yang mampu menyelamatkan sel-sel tubuh manusia dari bahaya radikal bebas adalah antioksidan (Rohmatussolihat, 2009).

Antioksidan merupakan senyawa pendonor elektron yang mampu menangkap senyawa asing yang bersifat sebagai radikal bebas (senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan) (Winarsi, 2007). Antioksidan dapat menghambat atau menunda oksidasi suatu molekul dengan cara mengakhiri reaksi berantai inisiasi dan propagasi (Molyneux, 2004).

Benalu merupakan tumbuhan parasit, yang awalnya dianggap tumbuhan tersebut merugikan karena dapat merusak tanaman inang tempat tumbuhnya. Namun benalu berpotensi sebagai ramuan obat-obatan. Secara tradisional beberapa spesies benalu sejak jaman dahulu telah

digunakan untuk mencegah dan mengobati berbagai penyakit diantaranya sebagai obat batuk, kanker, diuretik, antiradang, antibakteri, luka atau infeksi kapang (Anita et al. 2014).

Kandungan kimia yang terdapat dalam benalu adalah fenolik, tanin, asam amino, karbohidrat, alkaloid dan saponin. Senyawa fenolik sangat berperan aktif sebagai antioksidan. Senyawa fenolik memiliki struktur yang dengan mudah dapat menyumbangkan hidrogen atau elektron terhadap asektor seperti spesi oksigen reaktif atau gugus peroksil dari lemak, sehingga dapat meredam keaktifan oksigen dan radikal peroksil (Sembiring *et al*, 2016).

Berdasarkan uraian diatas, bahwa tanaman benalu yang dikenal masyarakat sebagai tanaman yang dapat merusak tanaman yang ditumbuhinya, ternyata berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya memiliki manfaat sebagai antioksidan, sehingga peneliti tertarik untuk melakukan penelitian tentang daun benalu inang pohon petai (*Scurrula atropurpurea* Dans.) dengan menguji kadar fenolik total menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* yang dinyatakan dengan massa ekuivalen asam galat dan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} .

2. METODE PENELITIAN

A. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: daun benalu petai, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), etanol 96%, metanol p.a, aquadest, serbuk vitamin C, kuersetin, serbuk Mg, natrium karbonat, asam klorida, pereaksi meyer, pereaksi dragendorf, $FeCl_3$, pereaksi *Folin-Ciocalteu*, asam galat. Kuersetin, $AlCl_3$.

B. Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini antara lain: timbangan analitik (OHAUS), pisau, blender, toples

maserasi, batang pengaduk, cawan penguap, alat *rotary evaporator*, kain flanel, kertas saring, aluminium foil, corong, erlenmeyer, beaker glass, oven, inkubator, alat vortex, sudip, pot salep, pipet tetes, mikropipet, pipet volume, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, kuvet, alat Spektrofotometri UV-Vis (SHIMADZU).

C. Jalannya Penelitian

1) Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman benalu petai dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematik Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Determinasi tumbuhan ini untuk memastikan bahwa tumbuhan yang digunakan untuk penelitian adalah jenis benalu (*Scurrula atropurpurea* Dans.).

2) Pengambilan dan Pengolahan Sampel

Daun benalu diambil dari pohon petai yang terdapat di Kecamatan Wonotunggal Kabupaten Batang. Pemanenan dilakukan pada pagi hari. Sortasi basah daun benalu dilakukan dengan cara memisahkan dari bahan-bahan pengotor seperti bagian tanaman yang tidak dibutuhkan (batang, ranting, bunga dan akar) dan bahan-bahan pengotor lainnya. Proses pencucian daun benalu dilakukan dengan cara dialiri air yang mengalir sambil dibersihkan dari kotoran yang menempel. Selanjutnya proses pengeringan daun benalu yang masih basah dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari dan ditutupi dengan kain hitam sampai kering. Akhir dari proses pengeringan ditandai dengan mudah dipatahkannya pada setiap bagian daun benalu tersebut, kemudian sortasi kering dilakukan dengan cara daun benalu yang sudah kering dipisahkan dari bahan-bahan pengotor lain yang masih tercampur

didalam simplisia kering seperti bagian batang, bahan-bahan yang rusak, dan pengotor lain. Selanjutnya simplisia daun benalu yang sudah kering kemudian dibuat menjadi serbuk dengan cara diblender hingga menjadi serbuk dan diayak dengan ayakan nomor mesh 40.

3) Pembuatan Ekstrak metode maserasi

Serbuk simplisia daun benalu petai ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam bejana maserasi dan ditambah 1,5 L etanol 96% sampai terendam sempurna dan dicampur hingga homogen. Campuran dimaserasi dengan suhu ruangan selama 5 hari dan dilakukan pengadukan satu kali 1 jam perhari. Maserat disaring dengan menggunakan kain flanel melalui corong sehingga menghasilkan filtrat dan didapat filtrat 1, lalu ampas kembali dimaserasi dengan ditambah 1 L etanol 96% selama 3 hari, hingga filtrat hampir tidak berwarna dan didapat filtrat 2, selanjutnya hasil dari filtrat 1 dan filtrat 2 dijadikan satu dan diuapkan pelarutnya dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak disimpan dengan wadah kaca tertutup rapat dan terlindung dari paparan cahaya matahari.

4) Penapisan Fitokimia

i. Alkaloid

Sejumlah 0,5 gram ekstrak daun benalu petai ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh digunakan untuk uji alkaloid. Diambil sejumlah 2 tabung reaksi, kemudian masing-masing tabung reaksi dimasukkan 0,5 ml filtrat, pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi meyer, dan dragendorf.

Hasil positif alkaloid akan ditunjukkan jika terjadi endapan atau kekeruhan (Supomo dkk., 2016).

ii. Flavonoid

Sejumlah ekstrak daun benalu petai ditambah metanol dan dipanaskan diatas penangas air, ditambahkan serbuk Mg 0,1 mg dan ditambah 5 tetes HCl pekat. Reaksi positif flavonoid akan ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga.

iii. Saponin

Sejumlah ,5 gram ekstrak daun benalu petai dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dimasukkan 10 ml air panas, didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif saponin akan menunjukkan jika terbentuk buih yang banyak selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1-10 cm dan tidak hilang jika dilakukan penambahan 1 tetes HCl 2N (Supomo dkk., 2016).

iv. Fenol

Sejumlah sampel diekstraksi dengan 20 ml etanol 96%. Ambil 1 ml filtrat tambahkan 2 tetes larutan FeCl₃ 5%. Reaksi positif fenol akan menunjukkan terbentuknya warna hijau atau hijau biru (Syafitri dkk., 2014).

v. Tanin

Sejumlah 1 gram ekstrak daun benalu petai dididihkan selama 3 menit dalam 10 ml aquadest, lalu didinginkan dan disaring. Filtrat diencerkan sampai hampir tidak berwarna, lalu tambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida. Hasil positif tanin ditunjukkan jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Supomo., 2016).

5) Uji kandungan fenolik total

i. Pembuatan larutan induk asam galat

Ditimbang sebanyak 50 mg asam galat larutkan dengan 1 ml etanol 96% dan tambahkan aquadest sampai 50 ml sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 µg/mL.

ii. Pembuatan kurva kalibrasi asam galat

Dari larutan induk asam konsentrasi 1000 µg/mL kemudian dipipet sebanyak 0,25 mL; 0,5 mL; 1 mL; 1,5 mL; 2 mL dan 3 mL. Setelah itu diencerkan dengan aquades sampai volume akhir 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 25; 50; 100; 150; 200; 300 µg/mL asam galat. Dari masing-masing konsentrasi asam galat dipipet sebanyak 0,2 mL lalu ditambah 15,8 mL aquades dan 1 mL Reagen Folin-Ciocalteu dan divortex hingga homogen serta didiamkan selama 8 menit. Setelah itu ditambahkan 3 mL larutan Na₂CO₃ 10% lalu divortex hingga homogen, dan selanjutnya didiamkan selama 2 jam pada suhu kamar. Ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm, lalu dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (µg/mL) dengan serapan (Marjoni dkk, 2015).

iii. Penentuan kandungan fenolik total

Sebanyak 100 mg ekstrak daun benalu petai dilarutkan dengan aquades sampai 10 mL sehingga diperoleh konsentrasi 10 mg/mL. dari konsentrasi 10 mg/mL dipipet 1 mL dan diencerkan dengan aquades hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Dipipet sebanyak 0,2 mL lalu ditambahkan 15,8 mL aquades dan 1 mL reagen *Folin-Ciocalteu* lalu divortex dan didiamkan selama 8 menit. Setelah itu

ditambahkan 3 mL Na₂CO₃ 10% kedalam larutan dan didiamkan larutan tersebut selama 2 jam pada suhu kamar. Diukur serapannya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang serapan maksimum 765 nm. Hasil kadar fenol yang diperoleh dinyatakan sebagai mg ekuivalen asam galat (GAE)/g sampel (Marjoni dkk, 2015). Perhitungan kandungan total fenolik menggunakan rumus sebagai berikut:

$$TCP = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi fenolik (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan

6) Uji Flavonoid Total

i. Pembuatan larutan standar kuersetin

Sebanyak 10 mg kuersetin (pembanding) ditimbang dan dilarutkan dalam 100 ml metanol sebagai larutan stok.

ii. Pengenceran kuersetin

Dibuat pengenceran kuersetin dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40; 50 µg/mL sebagai larutan kuersetin pembanding.

iii. Pembuatan kurva kalibrasi kuersetin

Sebanyak 0,5 ml dari masing-masing konsentrasi larutan pembanding (kuersetin) diencerkan dengan 1,5 ml metanol kemudian di tambahkan 0,1 mL AlCl₃10%, 0,1 mL Kalium Asetat 1 M dan 2,8 mL aquadest. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit. Ukur serapan dari masing-masing larutan pembanding dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 436 nm.

Masing-masing larutan pembanding diukur tiga kali. Setelah diperoleh absorbansi dari masing-masing larutan pembanding, dibuat kurva kalibrasi dan diperoleh regresi persamaan linear (Salmia, 2016).

iv. Pengukuran kadar flavonoid total ekstrak daun benalu petai (*Scurrula atropurpurea* Dans.)

Sebanyak 20 mg sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 10 ml metanol sehingga diperoleh konsentrasi 2000 µg/ml. Diambil sebanyak 1 mL dan ditambahkan 10 mL metanol dipipet 1 mL dan diencerkan dengan aquades hingga 10 mL dan diperoleh konsentrasi 1 mg/mL. Sebanyak 0,5 ml sampel uji ditambahkan dengan 1,5 ml metanol, kemudian ditambahkan 0,1 ml aluminium (III) klorida 10%, 0,1 ml Natrium asetat 1 M, dan 2,8 ml aquadest. Setelah diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi diukur menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Salmia, 2016). Perhitungan kandungan total flavonoid menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total flavonoid} = \frac{C \times V \times fp}{g}$$

Keterangan :

C = Konsentrasi Kuersetin (nilai x)

V = Volume ekstrak yang digunakan (mL)

fp = Faktor pengenceran

g = Berat sampel yang digunakan

7) Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan menggunakan

prosedur seperti yang telah dilakukan oleh Syaifudin (2015):

i. Pembuatan Larutan DPPH

Sebanyak 2,5 mg DPPH dilarutkan dengan metanol dalam labu ukur 25 mL sehingga diperoleh larutan stok DPPH dengan konsentrasi 100 µg/mL larutan tersebut ditutup dengan aluminium foil dan harus dibuat baru.

ii. Penentuan panjang gelombang DPPH

Sebanyak 1 mL larutan DPPH 100 µg/mL dimasukkan dalam tabung reaksi. Ditambah 3 mL metanol. Larutan dihomogenkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya ditentukan panjang gelombang optimumnya, diukur absorbansinya pada panjang gelombang 510-525 nm.

iii. Pembuatan larutan blanko

Sebanyak 1 mL larutan DPPH sebesar 100 µg/mL dimasukkan kedalam tabung reaksi. Kemudian tambahkan 3 mL metanol p.a dan dihomogenkan lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Ukur serapan pada panjang gelombang maksimum.

iv. Pengujian vitamin C

Vitamin C ditimbang sebanyak 25 mg dilarutkan dengan metanol p.a 25 mL pada labu ukur hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 µg/mL. Diambil larutan tersebut sebanyak 0,025 mL; 0,05 mL; 0,075 mL dan 0,1 mL, lalu masukkan pada labu ukur 10 mL dengan ditambahkan metanol hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi berturut-turut sebesar 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL dan 10 µg/mL. Sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi

larutan dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 1 mL DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan 2 mL metanol. Homogenkan dengan cara divortex kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya dari masing-masing larutan diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

v. Pengujian antioksidan ekstrak daun benalu petai

Timbang sebanyak 25 mg ekstrak daun benalu petai dilarutkan dengan metanol p.a dalam labu ukur 25 mL hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi sebesar 1000 µg/mL. Selanjutnya diambil sebanyak 0,025 mL, 0,05 mL, 0,075 mL, 0,1 mL, lalu masukan dalam labu ukur 10 mL diencerkan dengan metanol p.a hingga tanda batas sehingga diperoleh konsentrasi berturut-turut sebesar 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 7,5 µg/mL dan 10 µg/mL. Dari masing-masing konsentrasi tersebut diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditambahkan 1 mL DPPH 100 µg/mL dan diencerkan dengan 2 mL metanol p.a. Homogenkan dengan cara divortex kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya masing-masing konsentrasi diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder. Suatu ekstrak dari bahan alam terdiri atas berbagai macam metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas biologisnya. Senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi

yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit sekunder (Harborne, 1987). Penapisan fitokimia pada penelitian ini untuk mengetahui senyawa kimia yang terdapat didalam ekstrak daun benalu petai.

Tabel 1 Hasil penapisan fitokimia ekstrak daun benalu petai

Metabolit Sekunder	Hasil	Keterangan
Alkaloid	+	Terbentuk endapan putih (pereaksi mayer), terbentuk endapan merah bata (pereaksi dragendorff)
Flavonoid	+	Terbentuk warna merah
Saponin	+	Terbentuk busa
Fenol	+	Terbentuk warna hijau kehitaman
Tanin	+	Terbentuk warna hijau kehitaman

Keterangan : (+) mengandung golongan senyawa
(-) tidak mengandung senyawa

Berdasarkan tabel 1 diketahui bahwa hasil uji penapisan fitokimia ekstrak daun benalu petai terbukti mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, fenol dan tanin.

B. Penentuan Kandungan Fenolik Total

Penentuan kandungan fenolik total bertujuan untuk melihat korelasi antara aktivitas antioksidan dengan kandungan fenolik totalnya. Penentuan kandungan fenolik total dapat dilakukan dengan menggunakan pereaksi Folin-Ciocalteu. Penentuan kandungan fenolik total dimulai dengan membuat kurva baku asam galat. Asam galat digunakan sebagai standar kurva baku karena asam galat merupakan turunan dari asam hidrogenbenzoat yang tergolong asam fenol sederhana. Kandungan fenol asam organik ini juga bersifat murni dan stabil (Lee, *et al.*, 2003).

Menurut Hacı *et al.*, (2009), prinsip reaksi pada metode Folin-Ciocalteu adalah ion fenolat akan mereduksi asam fosfomolibdat-fosfotungstat dalam reagen

Folin-Ciocalteu dalam suasana basa selama proses oksidasi fenol menjadi senyawa kompleks *molybdenum-tungsten* berwarna biru. Ion fenolat dibentuk melalui disosiasi proton dalam suasana basa yang didapatkan dari suatu senyawa alkali. Senyawa alkali yang digunakan adalah natrium karbonat.

Semakin besar konsentrasi senyawa fenolik maka ion fenolat yang terbentuk pun semakin banyak, sehingga semakin banyak ion fenolat yang mereduksi fosfomolibdat dan fosfotungstat yang menyebabkan warna biru yang terbentuk semakin pekat, hal ini menyebabkan absorbansi yang terukur pun akan semakin besar.

Pada penetapan kandungan fenolik total ekstrak daun benalu petai, larutan menunjukkan warna biru setelah ditambahkan reagen Folin-Ciocalteu dan larutan natrium karbonat. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat senyawa fenolik yang terkandung didalam ekstrak daun benalu petai.

Potensi senyawa fenolik sebagai antioksidan disebabkan oleh keberadaan gugus hidroksil dalam senyawa fenol. Gugus hidroksil berfungsi sebagai penyumbang atom hidrogen ketika

bereaksi dengan senyawa radikal melalui mekanisme transfer elektron sehingga proses oksidasi dapat terhambat (Wijayanti, 2016).

Pembuatan kurva baku asam galat digunakan untuk mencari persamaan regresi linier yang digunakan untuk menentukan jumlah kandungan total fenol dalam sampel. Pembuatan kurva baku asam galat dilakukan sebanyak tiga replikasi dan untuk menentukan kandungan fenolik total dilakukan dengan mengukur serapan pada panjang gelombang maksimum. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan adalah 767,9 nm. Hasil korelasi antara konsentrasi dan absorbansi yang dihasilkan adalah $r^2 = 0,9994$. Semakin baik nilai linearitas (nilai $r^2 = 1$ atau mendekati 1) maka korelasi juga semakin baik (Jesmile, 2016).

Berdasarkan perhitungan menggunakan persamaan regresi linear, $y = 0,0012x + 0,0783$, maka didapatkan kandungan fenolik total ekstrak daun benalu petai sebesar $198,083 \pm 1,443$ mg ekuivalen asam galat per g ekstrak (mg GAE/g E daun benalu petai), hasil dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 2 Hasil pengukuran kandungan total fenol ekstrak daun benalu petai

Replikasi	Absorbansi	Fenolik Total (mg GAE/g ekstrak)	$\bar{x}$ Fenolik Total (mg GAE/g ekstrak)
1	0,315	197,25	198,083±1,443
2	0,318	199,75	
3	0,315	197,25	

C. Penentuan Kandungan Flavonoid Total

Pada penetapan kandungan flavonoid total ditentukan dengan menggunakan metode kolorimetri. Prinsip penetapan kadar flavonoid total dengan metode $AlCl_3$ adalah terjadinya pembentukan kompleks antara alumunium klorida dengan gugus keton pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari golongan flavon dan flavonol. Senyawa yang digunakan sebagai standar pada penetapan kadar

flavonoid total ini adalah kuersetin, karena kuersetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keton pada atom C-4 dan juga gugus hidroksil pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga (Azizah, 2014).

Untuk Penentuan flavonoid total, terlebih dahulu dilakukan pengukuran absorbansi pada larutan standar yang akan digunakan sebagai pembanding pada pengukuran senyawa flavonoid total pada sampel. Pengukuran absorbansi dilakukan

dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum 439,5 nm. Warna yang dihasilkan dari larutan standar kuersetin adalah kuning. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan semakin pekat warna kuning yang dihasilkan. Kuersetin dipilih sebagai standar karena kuersetin merupakan senyawa yang paling luas penyebarannya yang terdapat pada tumbuhan. Kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid. Dan juga termasuk senyawa flavonoid yang paling efektif menangkap radikal bebas (radikal hidroksil, superoksida, dan peroksil) serta menghambat berbagai reaksi oksidasi karena dapat menghasilkan radikal fenolik yang terstabilkan oleh efek resonansi dari cincin aromatis (Kusuma, 2012 dan Salmia, 2016).

Pada pengukuran kadar flavonoid total ekstrak daun benalu petai untuk penentuan kurva baku kuersetin dilakukan replikasi sebanyak tiga replikasi. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari pengukuran kuersetin adalah 439,5

nm. Dari ketiga replikasi persamaan regresi linear yang diambil untuk perhitungan kadar flavonoid total adalah nilai $r = 1$ atau mendekati 1.

Persamaan regresi linear yang didapat adalah $y = 0,0102x + 0,0689$. Larutan standar senyawa flavonoid diperoleh hubungan yang linear antara absorbansi dengan konsentrasi, pada pengukuran absorbansi dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9962. Nilai r^2 yang digunakan adalah nilai r yang mendekati satu menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linear dan terdapat hubungan antara konsentrasi larutan kuersetin dengan nilai serapan.

Penentuan kadar flavonoid ekstrak daun benalu petai dilakukan tiga replikasi. Penentuan kadar senyawa flavonoid total pada sampel dinyatakan dalam miligram ekuivalen kuersetin tiap gram ekstrak.

Dari hasil perhitungan menunjukkan bahwa ekstrak daun benalu petai adalah sebesar $148,05 \pm 4,444$ mg QE/g ekstrak. Hasil pengukuran kandungan flavonoid total dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 3 Hasil pengukuran kandungan flavonoid total ekstrak daun benalu petai

Replikasi	Absorbansi	Flavonoid Total (mg QE/g ekstrak)	$\bar{x}$ Flavonoid Total (mg QE/g ekstrak)
1	0,362	146,55	$148,05 \pm 4,444$
2	0,375	153,05	
3	0,358	144,55	

D. Penentuan Aktivitas Antioksidan

Metode yang digunakan dalam penentuan aktivitas antioksidan adalah metode serapan radikal DPPH. Metode ini digunakan karena merupakan metode yang sederhana, mudah dan menggunakan sampel dalam jumlah yang sedikit dengan waktu yang singkat. Metode pengujian ini berdasarkan pada kemampuan substansi antioksidan tersebut dalam menetralkan radikal bebas. Radikal bebas yang digunakan adalah DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl*) (Syiafuddin, 2015).

Prinsip pengukuran aktivitas antioksidan secara kuantitatif

menggunakan metode DPPH ini adalah adanya perubahan intensitas warna ungu DPPH yang sebanding dengan konsentrasi larutan DPPH tersebut. Radikal bebas DPPH yang memiliki elektron tidak berpasangan akan memberikan warna ungu. Warna akan berubah menjadi kuning saat elektronnya berpasangan. Perubahan intensitas warna ungu ini terjadi karena adanya peredaman radikal bebas yang dihasilkan oleh bereaksinya molekul DPPH dengan atom hidrogen yang dilepaskan oleh molekul senyawa sampel sehingga terbentuk senyawa *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl* dan

menyebabkan terjadinya peluruhan warna DPPH dari ungu ke kuning. Perubahan warna ini akan memberikan perubahan absorbansi pada panjang gelombang maksimum DPPH saat diukur menggunakan spektrofotometri UV-Vis sehingga akan diketahui nilai aktivitas peredaman radikal bebas yang dinyatakan dengan nilai IC_{50} . Nilai IC_{50} didefinisikan sebagai besarnya konsentrasi senyawa uji yang dapat meredam radikal bebas sebanyak 50%. Semakin kecil nilai IC_{50} maka aktivitas peredaman radikal bebas semakin tinggi (Molyneux, 2004).

Berikut gambar ekstrak daun benalu petai yang direaksikan dengan larutan DPPH:



Larutan uji ekstrak daun benalu petai + DPPH



Hasil larutan uji ekstrak daun benalu petai setelah direaksikan dengan DPPH

Penentuan panjang gelombang serapan maksimum menggunakan larutan blanko yaitu DPPH yang dilarutkan dalam metanol p.a tanpa penambahan sampel dengan tujuan untuk mendapatkan panjang gelombang serapan maksimum DPPH tanpa gangguan senyawa lain yang ada dalam sampel. Panjang gelombang maksimum yang didapatkan yaitu 515 nm.

Cara mendapatkan IC_{50} yaitu dengan mengukur absorbansi seri larutan dari ekstrak daun benalu yang diukur sehingga akan diperoleh persamaan regresi dari hubungan presentase daya hambat absorbansi larutan uji dengan konsentrasi

dari larutan uji yang diukur. persamaan regresi yang diperoleh ini dapat digunakan untuk menghitung konsentrasi larutan uji yang dapat menghambat radikal DPPH sebesar 50%. Vitamin C digunakan sebagai pembanding. Vitamin C merupakan suatu antioksidan yang larut dalam air. Memiliki rumus $C_6H_8O_6$ yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan yang besar karena bersifat sebagai reduktor. Sifat reduktor tersebut disebabkan oleh mudah terlepasnya atom-atom hidrogen pada gugus hidroksil yang terikat pada atom C_2 dan atom C_3 (atom-atom C pada ikatan rangkap), sehingga radikal bebas dapat dengan mudah menangkapnya dan membentuk radikal bebas tereduksi yang stabil (Soewoto, 2001).

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan membuat empat konsentrasi vitamin C dan ekstrak daun benalu petai yang berbeda-beda (2,5; 5; 7,5; 10 $\mu\text{g/mL}$) dan dilakukan sebanyak tiga replikasi.

Setelah pengukuran didapat data absorbansi kemudian dihitung persen inhibisinya. 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 absorbansi sampel yang diukur dengan spektrofotometer UV-Vis (Molynueux, 2004).

Parameter yang digunakan untuk menunjukkan aktivitas antioksidan adalah *inhibition concentration* (IC_{50}). Penentuan IC_{50} dari masing-masing ekstrak bertujuan untuk memperoleh jumlah dosis ekstrak yang dapat menurunkan intensitas serapan atau penangkapan radikal bebas DPPH sebesar 50% dibandingkan dengan larutan kontrol negatif, dihitung secara regresi linear berdasarkan 4 titik konsentrasi (2,5; 5; 7,5; 10 $\mu\text{g/mL}$). Dari hasil interpolasi maka kemudian diperoleh nilai IC_{50} untuk masing-masing ekstrak. Semakin kecil

IC_{50} berarti aktivitas antioksidanya semakin tinggi (Wachidah, 2013).

Hasil perhitungan IC_{50} ekstrak daun benalu petai dan pembanding vitamin C dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Tabel 4 Hasil perhitungan IC_{50} ekstrak daun benalu petai dan pembanding vitamin C

Sampel	Replikasi	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$\bar{x}$ IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Daun benalu petai	1	23.630	23.48 ± 0.036
	2	23.353	
	3	23.457	
Vitamin C	1	13.437	13.471 ± 0.047
	2	13.410	
	3	13.567	

Hasil tabel diatas menunjukkan bahwa hasil pengukuran aktivitas antioksidan vitamin C dan ekstrak daun benalu petai dengan rata-rata IC_{50} vitamin C adalah 13.471 ± 0.047 ($\mu\text{g/mL}$) dan rata-rata IC_{50} ekstrak daun benalu petai adalah 23.48 ± 0.036 ($\mu\text{g/mL}$), hal ini berarti untuk menangkap radikal bebas sebesar 50 % diperlukan konsentrasi vitamin C sebesar 13.471 ± 0.047 ($\mu\text{g/mL}$), sedangkan konsentrasi ekstrak daun benalu petai yang diperlukan sebesar 23.48 ± 0.036 ($\mu\text{g/mL}$). Semakin kecil nilai IC_{50} , maka sampel uji memiliki keefektifan sebagai antioksidan yang baik.

seperti BCB (β -carotene bleaching assay) dan FRAP (Ferric Reducing Antioxidant).

5. REFERENSI

- Anita, A., Khotimah, S. & Yanti, A.H. (2014). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrophtheo pentandra* (L.) Miq Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Protobiont*. 3(2): 266 – 271.
- Azizah, D.N., Kumolowati, E., Faramayuda, F. (2014). Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl_3 Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Kartika Junal ilmiah Farmasi* 2(2), 45-49
- Haci, I.A.E., Didi, A., Bekkara, F.A., Gherib, M. (2009). In Vitro Antioxidant Activity and Total Phenolic Contents in Methanol Crude Extracts From The Algerian Medicinal Plant *Limoniastrum feei*, *Scientific Study and Research*. X(4). 329-336
- Harborne, J.B. (1996). *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terbitan Kedua. Bandung: ITB Bandung.
- Jesmile, V. (2016). Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Ekstrak Metanol Daun Cabe Jawa (*Piper retrofactum* Vahl.). *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Kate, D.I., (2014). Penetapan Kandungan Fenolik Total dan Uji Aktivitas
- ## 4. SIMPULAN
- A. Kesimpulan
- Hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun benalu petai memiliki nilai fenolik total sebesar $198,083 \pm 1,443$ mg GAE/g ekstrak. Nilai flavonoid total sebesar $148,05 \pm 4,444$ mg QE/g ekstrak dan memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai IC_{50} sebesar 23.48 ± 0.036 $\mu\text{g/mL}$.
- B. Saran
- 1) Perlu dilakukan pengujian aktivitas antioksidan ekstrak batang benalu petai.
 - 2) Perlu dilakukan pengujian ekstrak daun benalu petai sebagai anti kanker
 - 3) Perlu dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan metode lain

- Antioksidan dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Ekstrak Metanolik Umbi Bidara Upas (*Merremia mammosa* (Lour) Hallier f.). *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., dan Lee, C.Y. (2003). Cocoa Has More phenolic Phytochemicals and A Higher antioxidant Capacity Than Teas and Red Wine, *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 7292-7295.
- Marjoni M. R., Afrinaldi, Novita A. D.(2015). Kandungan Total Fenol dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air Daun Kersen (*Muntingia calabura* L.). *Jurnal Kedokteran Yarsi*, **23**(3),187-196.
- Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*.
- Rohmatussolihat. (2009). Antioksidan, Penyelamat Sel-Sel Tubuh Manusia. *Bio Trends*, **4** (1).
- Salmia (2016), Analisis Kadar Flavonoid Total Ekstrak Kulit Batang Kedondong Bangkok (*Spondias Dulcis*) dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar.
- Sembiring, H.B., Lenny, S. & Marpaung, L, (2016), Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoida dari Daun Benalu Kakao (*Dendrophthoe Pentandra* (L.) Miq.), Departmen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sumatera Utara, Medan, *Chimica et Natura Acta* Vol. 4 No. 3, hlm.117-122.
- Soewoto, H., (2001). *Antioksidan Eksogen Sebagai Lini Peratahanan Kedua Dalam Menanggulangi Peran radikal Bebas*. Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran UI. Jakarta.
- Supomo, Supriningrum R., Junaid R. (2016). Karakterisasi Dan Skrining Fitokimia Daun Karehau (*Callicarpa Longifolia* lamk.) *Jurnal Kimia Mulawarman*, **13**(2), 89-96
- Suryohudoyo, P., 1993, Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas, *Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Unair*, pp. 2-9
- Syafitri N.E., Bintang M., Falah S. (2014). Kandungan Fitokimia, Total Fenol, dan Total Flavonoid Ekstrak Buah Harendong (*Melastoma affine* D. Don). *Current Biochemistry*, **1**(3), 105-115.
- Syaifuddin., (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Bayam Merah (*Alternanthera amoena* Voss.) Segar dan Rebus dengan Metode DPPH (1,1 –diphenyl-2-picrylhydrazyl). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Walisongo Semarang.
- Wachidah, L.N., (2013). Uji Aktivitas Antioksidan serta Penentuan kandungan Fenolat dan Flavonoid Total dari Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume). *Skripsi*. Universitas Islam Syarif Hidayatullah: Jakarta.
- Wijayanti, M.N. (2016). Uji Aktivitas Antioksidan dan Penetapan Kadar Fenolik Total Ekstrak Buah Buni (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) dengan Metode 2,2 diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dan Metode Folin-Ciocalteu. *Skripsi*. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Winarsi, H.,(2007), *Antioksidan Alami dan Radikal Bebas*, Kanisius, Deresan, Yogyakarta.