

Research Articles

Optimasi Kondisi Pengujian Senyawa Flavonoid Total di dalam Ekstrak Tanaman Sebagai Pengayaan Bahan Ajar Praktikum Makromolekul dan Hasil Alam di Laboratorium Kimia Organik

Lusi Suwartini^{1,*}, Nopri Yanti² dan Winta Efrinalia³

Laboratorium Terpadu, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan 30862

Received 25 November 2020; Accepted 31 Desember 2020; Published 14 Januari 2021

Keyword: flavonoids, plant extracts, optimization	ABSTRACT: Macromolecules and Natural Products are one of the practicums served by the Integrated Laboratory Unit and are new practicums, so that to meet the learning objectives it is necessary to test the appropriate practicum objects. The purpose of this research was to obtain the conditions that allow the total flavonoid compound to be used as an effective and efficient practicum object. In this research, the optimization of testing conditions for total flavonoids in <i>katuk</i> , <i>pandan</i> , and <i>mengkudu</i> leaf extracts with the spectrophotometric method using $AlCl_3$ reagent. As for the parameters used were the effect of volume and concentration of $AlCl_3$, CH_3COONa , reduction time and sampel weighton color stability of the $AlCl_3$ complex compound. From the results of this study, the optimum conditions were $AlCl_3$ with volume of 0,2 mL with a concentration of 5%, and CH_3COONa 0,2 mL with a concentration of 1 M. While the optimum reduction time was 45 minutes, and the optimum weight of leaf extract ranges from 50 mg-700 mg. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University.
Kata Kunci: flavonoid, ekstrak tanaman, optimasi	ABSTRAK: Makromolekul dan Hasil Alam merupakan salah satu praktikum yang dilayani UPT.Laboratorium Terpadu dan merupakan praktikum yang baru, sehingga untuk memenuhi tujuan pembelajaran perlu dilakukan uji coba objek praktikum yang sesuai. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan kondisi yang memungkinkan dari pengujian senyawa flavonoid total agar dapat digunakan sebagai objek praktikum yang efektif dan efisien. Pada penelitian ini dilakukan optimasi kondisi pengujian senyawa flavonoid total dalam ekstrak daun katuk, pandan dan mengkudu dengan metode spektrofotometri yang menggunakan pereaksi $AlCl_3$. Adapun parameter yang digunakan adalah pengaruh volume dan konsentrasi $AlCl_3$, CH_3COONa , waktu reduksi dan berat sampel terhadap kestabilan warna senyawa kompleks $AlCl_3$. Dari hasil penelitian ini diperoleh kondisi optimum $AlCl_3$ dengan volume 0,1 mL konsentrasi 5%, dan CH_3COONa 0,2 mL konsentrasi 1M. Sedangkan waktu reduksi optimum adalah 45 menit, dan berat optimum ekstrak daun berkisar antara 50 mg-700 mg. @2020 Published by UP2M, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Sriwijaya University.

* Corresponding author.

E-mail address: lusi_slamet@unsri.ac.id

PENDAHULUAN

Makromolekul dan Hasil Alam merupakan praktikum yang baru di Laboratorium Kimia Organik, sehingga diperlukan beberapa objek praktikum yang dapat mengakomodir tujuan pembelajaran. Evaluasi terhadap metode pengujian objek tersebut perlu dilakukan, agar efektif dan efisien serta dapat dilaksanakan dengan keterbatasan waktu praktikum yang hanya berlangsung selama 2 jam [1].

Pada penelitian ini dilakukan pengujian senyawa flavonoid total dalam ekstrak beberapa jenis tanaman. Penelitian-penelitian tentang senyawa flavonoid terus berkembang dengan pesat, sehingga laboratorium Kimia Organik sebagai penyelenggara praktikum Makromolekul dan Hasil Alam harus melakukan uji coba objek praktikum baru yang mengikuti perkembangan teknologi agar dapat memberikan pelayanan yang sesuai dengan kondisi saat ini.

Prosedur yang digunakan dalam pengukuran senyawa flavonoid total biasanya menggunakan metode spektrofotometri dan kromatografi. Metode spektrofotometri yang menggunakan pereaksi Aluminium Klorida dan Natrium Asetat banyak dipakai karena metodenya sederhana, dapat diulang (reproducible), sensitif, hasilnya relatif akurat dan tidak memerlukan peralatan yang spesifik dan canggih.

Beberapa prosedur pengukuran senyawa flavonoid total telah dilakukan oleh peneliti diantaranya dengan menggunakan volume dan konsentrasi yang bervariasi dari pereaksi AlCl_3 dan CH_3COOK [2][3][4], pereaksi AlCl_3 dan CH_3COONa [5][6][7], AlCl_3 , NaNO_3 dan NaOH [8]. Pada penelitian ini akan dipelajari pengaruh volume dan konsentrasi AlCl_3 dan CH_3COONa , waktu reduksi, dan pengaruh berat sampel terhadap pembentukan kompleks warna stabil dari AlCl_3 yang digunakan pada penentuan total senyawa flavonoid.

BAHAN DAN METODE

Dalam penelitian ini dilakukan optimasi kondisi pengujian yang meliputi parameter volume dan konsentrasi AlCl_3 , volume dan konsentrasi CH_3COONa , waktu reduksi serta berat sampel terhadap kestabilan warna senyawa kompleks AlCl_3 , dengan menggunakan metode spektrofotometri.

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia Organik UPT. Laboratorium Terpadu Universitas Sriwijaya pada bulan Mei s.d September 2020.

Prosedur Penelitian

Prosedur awal yang dilakukan dalam penelitian ini adalah membuat ekstrak pekat melalui beberapa tahap perlakuan dalam preparasi sampel.

Preparasi sampel

Sampel berupa daun katuk, mengkudu dan pandan diiris halus dan dikering anginkan. Kemudian sampel dihaluskan dengan Laboratory Blender dan diayak. Sampel dimaserasi menggunakan etanol 96 % dengan rasio 100 gr sampel: 500 mL pelarut etanol selama 72 jam. Maserat disaring dengan menggunakan kertas saring. Hasil rendemen tersebut dievaporasi dengan menggunakan LCD Rotary Evaporator RE 100-Pro sampai diperoleh ekstrak pekat.

Optimasi Kondisi Pengujian Senyawa Flavonoid Total

Tahap selanjutnya adalah melakukan optimasi kondisi dari volume dan konsentrasi pereaksi AlCl_3 dan CH_3COONa , waktu reduksi serta berat optimum sampel terhadap pengujian senyawa flavonoid total.

Pembuatan standar quersetin

Dibuat larutan standar quersetin 1000 ppm dengan melarutkan 25 mg quersetin dengan etanol 96% dalam labu ukur sampai

volumenya tepat 25 mL. Kemudian dari larutan standar diencerkan dan dibuat standar quersetin 5 ppm.

Penentuan volume dan konsentrasi optimum AlCl_3

Volume dan konsentrasi optimum AlCl_3 ditentukan dengan menggunakan larutan standar quersetin 5 ppm sebanyak 5 mL yang dimasukkan kedalam 10 tabung reaksi, kemudian ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi 0,1; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; 1 mL AlCl_3 dengan konsentrasi 3% dan 0,1 ml CH_3COONa 1 M, dihomogenkan dan diinkubasi 30 menit. Panjang gelombang maksimum di scan dengan menggunakan salah satu standar pada Spektrofotometer UV-Vis Single Beam merk Inscienpro Type US-120 PC. Absorbansi masing-masing larutan dibaca dengan menggunakan panjang gelombang optimum. Langkah-langkah ini diulangi untuk AlCl_3 konsentrasi 4 - 10%.

Penentuan volume dan konsentrasi optimum CH_3COONa

Digunakan larutan standar quersetin 5 ppm sebanyak 5 mL yang dimasukkan ke dalam 10 tabung reaksi, ditambahkan AlCl_3 dengan volume dan konsentrasi optimum pada masing-masing tabung reaksi, dan CH_3COONa dengan volume 0,1 mL; 0,2 mL; 0,3 mL; 0,4 mL; 0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL; 0,9 mL; 1 mL konsentrasi 0.5 M, kemudian dihomogenkan, diinkubasi 30 menit. Absorbansi masing-masing larutan dibaca pada panjang gelombang optimum. Langkah-langkah ini diulangi untuk CH_3COONa konsentrasi 1-2,5 M.

Penentuan waktu reduksi optimum

Dipipet larutan standar 5 ppm sebanyak 25 ml, ditambahkan AlCl_3 dan CH_3COONa dengan volume dan konsentrasi optimum. Kemudian dihomogenkan. Dibaca absorbansinya pada menit ke 5 - 90.

Penentuan kisaran linier larutan standar

Larutan standar dibuat dengan konsentrasi 1-10 ppm, dan dimasukkan kedalam 10 tabung reaksi. Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi AlCl_3 dan CH_3COONa dengan volume dan konsentrasi optimum, dihomogenkan dan diinkubasi dengan waktu reduksi optimum. Dibaca absorbansi masing-masing larutan standar pada panjang gelombang optimum. Kemudian dibuat kurva kalibrasi linier dan ditentukan nilai regresi linier ($R^2 > 0.998$).

Penentuan berat sampel optimum

Ditimbang masing-masing sampel ekstrak daun 100 mg, dilarutkan dengan etanol tepat 100 ml, kemudian larutan diencerkan dengan memipet 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 dan 10 ml, masing-masing dilarutkan dengan etanol 96% sampai volume larutan tepat 10 ml. Ditambahkan AlCl_3 , CH_3COONa dengan volume dan konsentrasi optimum, dihomogenkan dan diinkubasi selama waktu reduksi optimum. Absorbansi masing-masing sampel dibaca pada panjang gelombang optimum. Pengukuran sampel dilakukan secara duplo.

Analisis Data

Analisis parameter metode pengujian untuk volume dan konsentrasi Aluminium Klorida, Natrium Asetat, waktu reduksi dan berat sampel dilakukan dengan mengevaluasi nilai absorbansi hasil pengujian dengan kriteria Absorbansi optimum yang diambil. Untuk batas linier kurva kalibrasi dengan melihat nilai koefisien regresi linier (r) dari persamaan garis linier kurva.

Data optimasi kondisi yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan kadar flavonoid dalam sampel dengan menggunakan persamaan:

$$F = \frac{c \times V \times f}{m} 10^{-6} \times 100\% \dots\dots\dots [3]$$

dimana:

F: jumlah flavonoid metode AlCl_3

c: kesetaraan Quersetin (mg/L)

V: volume total ekstrak (mL)

f: faktor pengenceran

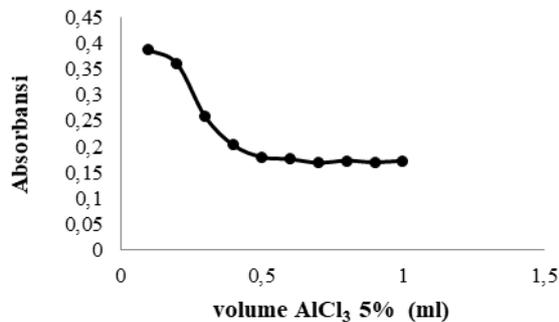
m: berat sampel (g)

HASIL DAN PEMBAHASAN

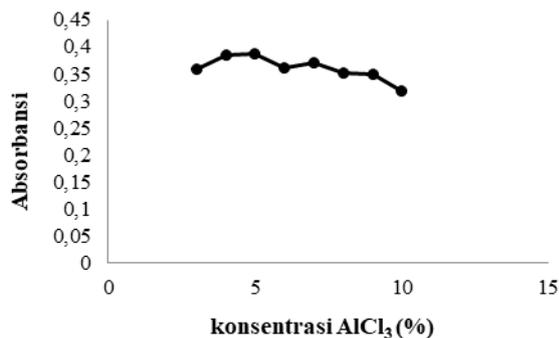
Hasil

Pengaruh volume dan konsentrasi optimum AlCl_3

Penentuan volume dan konsentrasi optimum AlCl_3 5% diukur pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 454,1nm. Hasil masing-masing dapat dilihat pada Gambar 1 dan 2. Pada gambar 1 diperoleh volume optimum 0,1 ml dan konsentrasi AlCl_3 optimum pada 4-5%.



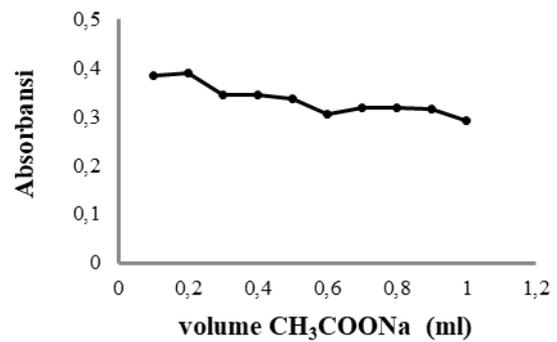
Gambar 1. Pengaruh volume AlCl_3 terhadap absorbansi



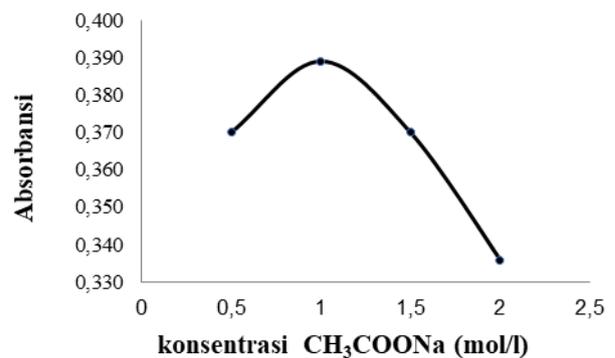
Gambar 2. Pengaruh konsentrasi AlCl_3 terhadap absorbansi

Pengaruh volume dan konsentrasi optimum CH_3COONa

Volume optimum CH_3COONa dapat dilihat pada Gambar 3 yaitu 0,2 ml dan konsentrasi CH_3COONa 1 M pada Gambar 4.



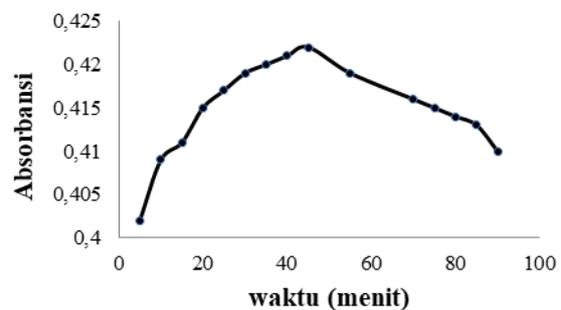
Gambar 3. Pengaruh volume CH_3COONa terhadap absorbansi



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi CH_3COONa terhadap absorbansi

Waktu reduksi optimum

Waktu reduksi optimum yang ditentukan dengan menggunakan 0,1 ml AlCl_3 5%, 0,2 ml CH_3COONa 1M dan dibaca pada panjang gelombang 454,1 nm terdapat pada menit ke 45 seperti diperlihatkan pada gambar 5.

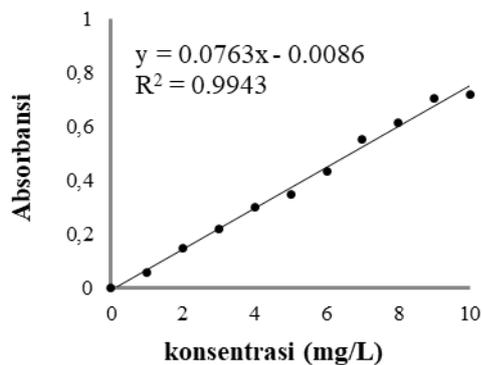


Gambar 5. Waktu reduksi optimum

Penentuan kisaran linier larutan standar

Kisaran linier larutan standar ditentukan pada panjang gelombang maksimum 454,1nm dengan kisaran konsentrasi quercetin 0-10 mg/L. Kurva larutan standar dapat dilihat pada gambar

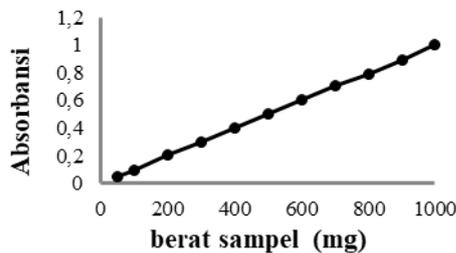
6.



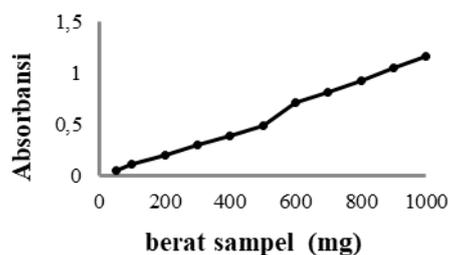
Gambar 6. Kurva larutan standar quersetin

Pengaruh berat sampel

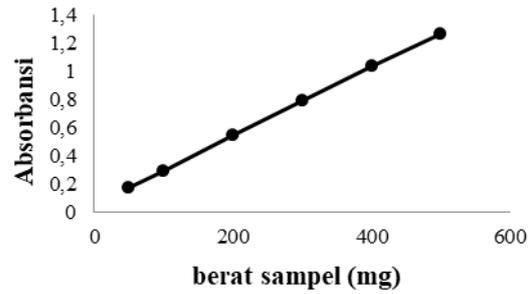
Tiga jenis sampel yang digunakan dalam penentuan berat sampel optimum menggunakan 0,1 ml AlCl₃ 5%, 0,2 ml CH₃COONa 1M, diinkubasi selama 45 menit dan diukur pada panjang gelombang 454,1 nm. Hasil masing-masing dapat dilihat pada Gambar 7, 8, dan 9.



Gambar 7. Pengaruh berat sampel mengkudu terhadap absorbansi



Gambar 8. Pengaruh berat sampel pandan terhadap absorbansi



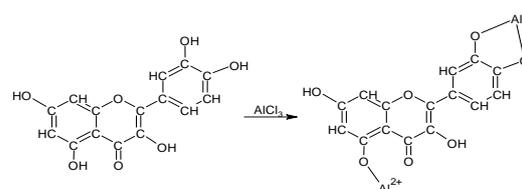
Gambar 9. Pengaruh berat sampel katuk terhadap absorbansi

Pembahasan

Pengaruh volume dan konsentrasi optimum AlCl₃

Kondisi optimum AlCl₃ yang diperoleh dari hasil penelitian adalah volume 0,1 ml dengan konsentrasi 5%, dimana pada kondisi tersebut terjadi serapan yang tertinggi dari senyawa kompleks Quercetin-Aluminium klorida. Penambahan Aluminium klorida akan membentuk kompleks yang stabil dengan C-4 gugus keto, serta pada C-3 atau C-5 gugus hidroksil dari flavon dan flavonol[9][10], sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah visible (tampak) yang ditandai dengan terbentuknya larutan berwarna lebih kuning[2]. Terbentuknya senyawa kompleks tersebut terjadi karena adanya reaksi reduksi-oksidasi antara flavonoid dan AlCl₃, dimana flavonoid sebagai reduktor [11] dan AlCl₃ sebagai oksidator [12].

Volume dan konsentrasi AlCl₃ yang lebih besar dari 0,1 ml dan 5% akan menyebabkan kemampuan mengoksidasi dari AlCl₃ tidak optimal. Hal tersebut diperlihatkan oleh nilai absorbansi yang kecil. Reaksi pembentukan senyawa kompleks quersetin-AlCl₃ dapat dilihat pada Gambar 7 [3].



Gambar 7. Reaksi pembentukan senyawa kompleks quersetin-AlCl₃

Pengaruh volume dan konsentrasi CH₃COONa

Volume 0,2 ml dan konsentrasi 1 M merupakan kondisi optimum dari CH₃COONa yang diperoleh dari hasil penelitian. Penambahan Natrium Asetat dalam penentuan senyawa flavonoid total adalah sebagai pereaksi geser [13] dan untuk mendeteksi adanya gugus 7-OH [3], selain itu juga untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visible (tampak) [2][14]. Penambahan Natrium asetat dengan volume dan konsentrasi optimum akan menghasilkan maksimum.

Kisaran linier larutan standar

Kisaran daerah kerja yang diperoleh dari hasil penelitian ini terletak pada absorbansi 0-0,706. Penentuan kisaran ini berdasarkan kurva linier larutan standar pada gambar 6, dimana hubungan linier antara konsentrasi larutan standar dan absorbansi diperlihatkan oleh persamaan $y = 0,0763x - 0,0086$ dengan regresi linier (R^2) 0,9943. Sedangkan nilai koefisien korelasi yang diperoleh 0,997 menunjukkan adanya hubungan yang sangat kuat diantara variabel yang digunakan[15].

Penentuan waktu reduksi optimum

Waktu reduksi adalah waktu yang dibutuhkan senyawa flavonoid untuk mereduksi AlCl₃ sehingga terbentuk senyawa kompleks yang berwarna kuning dari quersetin-aluminium klorida. Reaksi akan berjalan sempurna jika waktu yang dibutuhkan tepat dan menghasilkan intensitas warna yang lebih maksimal, sehingga absorbansi yang terbaca mempunyai nilai yang besar. Waktu reduksi 45 menit yang diperoleh dari hasil penellitian merupakan waktu yang mempunyai absorbansi tertinggi.

Penentuan berat sampel optimum

Berat sampel optimum yang akan digunakan dalam praktikum berdasarkan pada daerah kerja yang diperoleh dari kurva linier larutan standar, dimana absorbansi yang terbaca dari sampel harus berada dalam kisaran linier

larutan standar yaitu 0-0,706. Absorbansi yang berada pada kisaran kurva linier dari ketiga sampel dalam penelitian ini bervariasi, mengkudu dengan kisaran 50 mg-700 mg, pandan 50 mg-600 mg, katuk 50 mg-200 mg.

Dengan menggunakan data tersebut, maka berat sampel yang dapat dipakai dalam praktikum mempunyai kisaran 50 mg-700 mg, dengan ketentuan absorbansinya harus berada dalam garis linier kurva larutan standar. Seperti terlihat pada gambar (6) dengan konsentrasi diatas 9 ppm kurva menjadi tidak linier lagi. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi senyawa flavonoid dalam sampel, maka kemampuan senyawa flavonoid untuk mereduksi Aluminium Klorida semakin cepat, akan tetapi dengan semakin tingginya konsentrasi senyawa flavonoid membuat reduksi menjadi tidak optimal. Dengan demikian dalam penentuan berat sampel, absorbansi yang terbaca harus berada dalam range yang tepat.

Dengan menggunakan optimasi kondisi pengujian flavonoid dari hasil penelitian ini, maka diperoleh kandungan flavonoid dari sampel daun mengkudu, pandan, dan katuk secara berturut-turut yaitu 0,00137 %, 0,00147 % dan 0,0037 %.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan diperoleh kesimpulan bahwa kondisi optimum pada pengujian senyawa flavonoid total adalah AlCl₃ dengan vol. 0.1 ml konsentrasi 5%, CH₃COONa vol. 0.2 ml konsentrasi 1 M, waktu reduksi 45 menit dan berat optimum sampel dengan kisaran 50 mg-700 mg. Kondisi optimum yang diperoleh ini dapat digunakan sebagai SOP praktikum Makromolekul dan Hasil Alam, karena dengan waktu 2 jam kondisi tersebut dapat mengakomodir tujuan pembelajaran.

Ucapan terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Sriwijaya yang telah memberikan dana penelitian dengan nomorkontrak 0175.03/UN9/SB3.LPPM.PT/2020 tahun 2020 dengan skema penelitian Tenaga Kependidikan.

REFERENSI

- [1] Z. Zuraida, S. Sulistiyani, D. Sajuthi, and I. H. Suparto, "Fenol, Flavonoid, Dan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris* R.Br)," *J. Penelit. Has. Hutan*, vol. 35, no. 3, pp. 211–219, 2017, doi: 10.20886/jpjh.2017.35.3.211-219.
- [2] A. Aminah, N. Tomayahu, and Z. Abidin, "Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana* Mill.) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS," *J. Fitofarmaka Indones.*, vol. 4, no. 2, pp. 226–230, 2017, doi: 10.33096/jffi.v4i2.265.
- [3] K. Keahlian Biologi Farmasi and F. P. Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani Jl Terusan Jenderal Sudirman BOX, "Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl₃ Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Dyah Nur Azizah, Endang Kumolowati, Fahrauk Faramayuda," *Des*, vol. 2014, no. 2, pp. 45–49, 2014.
- [4] T. Bhaigyabati, P. G. Devi, and G. C. Bag, "Research Journal of Pharmaceutical , Biological and Chemical Sciences Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Aqueous Rhizome Extract of Three *Hedychium* Species of Manipur Valley . September - October," vol. 5, no. 970, pp. 970–976.
- [5] Sumaiyah, Masfria, and A. Dalimunthe, "Determination of total phenolic content, total flavonoid content, and antimutagenic activity of ethanol extract nanoparticles of *rhaphidophora pinnata* (L.f) schott leaves," *Rasayan J. Chem.*, vol. 11, no. 2, pp. 505–510, 2018, doi: 10.7324/RJC.2018.1122068.
- [6] P. Kadar, F. Pada, K. Batang, K. Raru, and S. Uv-vis, "1 , 1 , 2," vol. 4, no. 1, pp. 29–36, 2019.
- [7] R. Ahmed *et al.*, "Phenolic contents-based assessment of therapeutic potential of *Syzygium cumini* leaves extract," *PLoS One*, vol. 14, no. 8, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0221318.
- [8] O. Ullah Shirazi, M. Muzaffar Ali Khan Khattak, N. Azwani Mohd Shukri, M. A. Mohd Nur Nasyriq, O. Shirazi, and M. A. Nur Nasyriq, "Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activities of common herbs and spices," *J. Pharmacogn. Phytochem. JPP*, vol. 104, no. 33, pp. 104–108, 2014.
- [9] R. Supriningrum, N. Fatimah, and S. N. Wahyuni, "Penetapan Kadar Flavonoid Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.) Berdasarkan Perbedaan Cara Pengeringan," *J. Ilm. Manuntung*, vol. 4, no. 2, p. 156, 2018, doi: 10.51352/jim.v4i2.195.
- [10] Cahyanta, "Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Pare Metode Kompleks Kolorimetri dengan Pengukuran Absorbansi secara Spektrofotometri," *Electron. J. Politek. Harapan Bersama Tegal*, vol. 5, pp. 58–61, 2016.
- [11] Haeria and al. Hermawati. et, "Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) Haeria," *J. Pharm. Med. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 57–61, 2016.
- [12] M. P. J. R *et al.*, "Chimica et Natura Acta Penentuan Fenolik Total dan Flavonoid Ekstrak Etanol Kulit Batang," vol. 8, no. 1, pp. 36–41, 2020.
- [13] I. A. R. A. Asih, "Isolasi dan identifikasi senyawa isoflavon dari kacang kedelai (," pp. 33–40, 1907.

- [14] A. Fadillah, A. Rahmadani, and L. Rijai, "Analisis Kadar Total Flavonoid Dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kelubut (*Passiflora foetida* L.)," no. April, pp. 23–24, 2017, doi: 10.25026/mpc.v5i1.217.
- [15] D. S. Pratomo and E. Z. Astuti, "Analisis Regresi dan Korelasi Antara Pengunjung dan Pembeli Terhadap Nominal Pembelian di Indomaret Kedungmundu Semarang Dengan Metode Kuadrat Terkecil," *Ilmu Komput.*, no. 1, 2014.