

## Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Etanol Daun Johar (*Senna siamea* Lamk)

Dita Widia Ningrum<sup>a\*</sup>, Dewi Kusriani<sup>a</sup>, Enny Fachriyah<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Organic Chemistry Laboratory, Chemistry Department, Faculty of Sciences and Mathematics, Diponegoro University, Jalan Prof. Soedarto, Tembalang, Semarang 50275

\* Corresponding author: [ditawidian@gmail.com](mailto:ditawidian@gmail.com)

### Article Info

Keywords:  
 Johar leaves,  
 Flavonoids,  
 Antioxidant

Kata kunci:  
 Daun johar,  
 Flavonoid,  
 Antioksidan

### Abstract

This research is conducted about the isolation flavonoid compounds from ethanol extract of johar leaves (*Senna siamea* Lamk) and antioxidant activity test. This study aims to obtain flavonoid isolate, identify and test the antioxidant activity of flavonoid isolate from ethanol extract of johar leaves. Research methods divided into four stages, the first stage is isolation of flavonoid compounds. The second stage is the separation of flavonoid compounds using vacuum liquid chromatography, gravitational column chromatography and preparative thin layer chromatography. The third stage is identification of flavonoid isolate using UV-Vis spectrophotometer and FTIR. The fourth stage is antioxidant activity test by DPPH method. The result of flavonoid isolation was found flavonoid isolate weighing 0.006 gram (0.004%). Identification of flavonoid isolate using UV-Vis spectrophotometer showed that flavonoid isolate has the basic structure of flavon compound with maximum absorption at wavelength band I (350 nm) and band II (255 nm and 267 nm) and analysis using FTIR showed flavonoid isolate has functional groups such as O-H, C-H aliphatic, C=O, C=C aromatic, C-O ether and C-O alcohol so that the flavonoid isolate has the basic structure of the substituted luteolin compound. The result of antioxidant activity from flavonoid isolate showed IC<sub>50</sub> value is 139.8373 mg / L.

### Abstrak

Telah dilakukan penelitian tentang isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol daun johar (*Senna siamea* Lamk) serta uji aktivitas antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh isolat flavonoid, mengidentifikasi dan menguji aktivitas antioksidan isolat flavonoid dari ekstrak etanol daun johar. Metode penelitian dibagi menjadi empat tahap, tahap pertama yaitu isolasi senyawa flavonoid. Tahap kedua yaitu pemisahan senyawa flavonoid menggunakan kromatografi cair vakum, kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi lapis tipis preparatif. Tahap ketiga yaitu identifikasi isolat flavonoid menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. Tahap keempat adalah uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH. Hasil isolasi flavonoid didapatkan isolat flavonoid seberat 0,006 gram (0,004%). Identifikasi isolat flavonoid dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan bahwa isolat flavonoid memiliki struktur dasar senyawa flavon dengan serapan maksimum pada panjang gelombang pita I (350 nm) dan pita II (255 nm dan 267 nm) dan analisis menggunakan FTIR menunjukkan isolat flavonoid memiliki gugus fungsi O-H, C-H alifatik, C=O, C=C aromatik, C-O eter dan C-O alkohol sehingga diduga isolat flavonoid memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid menunjukkan IC<sub>50</sub> sebesar 139,8373 mg/L.

## 1. Pendahuluan

Indonesia merupakan negara yang terletak di kawasan tropis yang terkenal dengan kekayaan alamnya yaitu terdapat berbagai jenis tumbuhan yang berkhasiat obat. Kemampuan pengobatan secara tradisional banyak dibuktikan melalui berbagai pengalaman. Salah satu tanaman yang digunakan dalam pengobatan tradisional adalah tanaman *Senna siamea* Lamk atau yang dikenal sebagai tanaman Johar [1]. Tanaman johar telah digunakan secara tradisional sebagai obat penyakit kuning, sakit perut, nyeri haid, dan juga digunakan untuk mengurangi kadar gula dalam darah [2]. Ekstrak daun johar dilaporkan memiliki bioaktivitas sebagai antimalaria, antioksidan [1], antibakterial [3] dan antidiabetes [4]. Penelitian lain melaporkan dalam ekstrak metanol, etanol, dan etil asetat dari daun johar mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder yaitu alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, fenol, antrakuinon, antosianin, dan glikosida jantung [5]. Jenis flavonoid yang berhasil diisolasi dari ekstrak etanol daun johar adalah luteolin [6]. Uji aktivitas antioksidan dari isolat flavonoid ekstrak etanol daun johar belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol daun johar serta uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH.

## 2. Metode Penelitian

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun johar (*Senna siamea* Lamk), etanol 96%, etil asetat teknis, n-heksana teknis, eter teknis, butanol teknis, etil asetat p.a. (Merck), etanol p.a. (Merck), n-heksana p.a. (Merck), akuades, asam klorida 2 N (Merck), besi (III) klorida p.a., serbuk magnesium, pereaksi Dragendorff, pereaksi Meyer, pereaksi Libermann-Buchard, amil alkohol, amoniak 25% (Merck), kloroform p.a. (Merck), besi (III) klorida 1%, asam sulfat pekat 10% (Merck), metanol p.a. (Merck), plat KLT silika gel 60 GF254 (Merck), plat KLT silika gel F254 20x20 cm tebal 2,0 mm (Merck), silika gel 60 GF (Merck), silika gel 60 H (Merck), DPPH (*1,1-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) (Sigma-Aldrich), dan kuersetin (Sigma-Aldrich).

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari erlenmeyer, pipet tetes, gelas beker, corong gelas, corong pisah, botol vial, pipa kapiler, tabung reaksi, pengaduk kaca, penangas air, cawan penguap, wadah pengembang, blender, kertas saring, lampu detektor UV 254 nm dan 365 nm (CAMAG UV Cabinet 4), rotary vacuum evaporator (Buchi-B480), satu set alat kromatografi cair vakum, satu set alat kromatografi kolom gravitasi, neraca analitik (Kern-870), spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1280), FTIR (Perkin Elmer 10.4.00).

### Preparasi dan Penapisan fitokimia

Sampel penelitian berupa daun johar yang diperoleh dari daerah Purworejo. Daun johar yang diperoleh

dibersihkan, dikeringkan dan dihaluskan menjadi serbuk dan diuji penapisan fitokimia.

### Isolasi Flavonoid

Sebanyak 1475 gram serbuk daun johar dimaserasi dengan etanol 96% hingga jernih. Ekstrak yang diperoleh kemudian dievaporasi sampai mendapat ekstrak etanol dan ditimbang. Ekstrak etanol dilarutkan dalam etanol selanjutnya dilakukan penghilangan klorofil dengan menambahkan akuades (1:1), didiamkan selama 24 jam, lalu disaring. Filtrat diekstraksi dengan n-heksana. Fraksi etanol-air dihidrolisis dengan HCl 2 N selama 1 jam dalam suhu 85°C [7]. Fraksi hasil hidrolisis difraksinasi dengan etil asetat hingga didapatkan fraksi etil asetat kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya lalu ditimbang.

### Pemisahan Flavonoid

Fraksi etil asetat sebanyak 7,95 gram dilakukan pemisahan flavonoid dengan kromatografi cair vakum menggunakan fasa diam silika gel 60 GF254 dan fasa gerak menggunakan gradien tingkat kepolaran [7]. Fasa gerak yang digunakan yaitu kloroform, etil asetat dan etanol. Eluat-eluat yang dihasilkan dari kolom ditampung setiap 100 mL dalam botol vial. Masing-masing botol vial dianalisis menggunakan KLT dengan penambahan penampak bercak uap amoniak. Eluat-eluat yang menghasilkan pola noda yang sama digabungkan menjadi satu (Fraksi I). Fraksi I dipisahkan lebih lanjut dengan kromatografi kolom gravitasi menggunakan fasa diam silika gel 60 H dan fasa gerak berupa campuran kloroform, etil asetat, butanol (7:2,5:0,5). Eluat-eluat yang dihasilkan dari kolom ditampung setiap 15 mL dalam botol vial. Masing-masing botol vial dianalisis dengan KLT. Eluat-eluat yang menghasilkan pola noda yang sama digabungkan menjadi fraksi-fraksi besar (fraksi besar A,B,C,D,E, dan F) kemudian dilakukan analisis flavonoid menggunakan metode KLT dengan penambahan penampak bercak uap amoniak. Fraksi positif flavonoid dilakukan pemisahan dengan KLT preparatif menggunakan fasa diam plat silika gel 60 F254 ukuran 20 cm x 20 cm, ketebalan 0,5 mm-2,0 mm dan fasa gerak berupa campuran kloroform: metanol (9:1) hingga didapatkan isolat flavonoid.

### Uji Kemurnian

Uji kemurnian isolat flavonoid dilakukan dengan KLT berbagai eluen tunggal dan campuran serta KLT dua dimensi dengan eluen campuran hingga diperoleh noda tunggal.

### Identifikasi Struktur

Isolat flavonoid yang telah murni diidentifikasi strukturnya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR.

### Uji Aktiviitas Antioksidan

Isolat flavonoid dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan menggunakan metode KLT. Sampel ditotolkan pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan fasa

gerak yang cocok. Lempong plat dikeringkan dan disemprot dengan larutan DPPH 0,1 mM. Pengujian aktivitas antioksidan terhadap isolat flavonoid dilanjutkan dengan metode DPPH dan digunakan kuersetin sebagai pembanding. Isolat flavonoid dibuat variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm. Masing-masing konsentrasi dari isolat flavonoid sebanyak 0,2 mL dimasukkan ke dalam botol vial, kemudian ditambahkan 3,8 mL larutan DPPH 0,1 mM. Campuran dihomogenkan dan dibiarkan selama 30 menit dalam ruangan gelap, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515,5 nm. Perlakuan yang sama dilakukan terhadap kuersetin dengan variasi konsentrasi (5, 10, 15, 20 dan 25 ppm). Nilai absorbansi dari larutan uji dengan berbagai konsentrasi digunakan untuk menghitung aktivitas peredaman radikal DPPH (% inhibisi) dengan menggunakan persamaan berikut

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{A \text{ kontrol (DPPH)} - A \text{ sampel}}{A \text{ kontrol (DPPH)}} \times 100\%$$

Besarnya aktivitas antioksidan ditentukan dengan nilai IC50 yang dihitung dengan menggunakan persamaan yang diperoleh dari kurva regresi linier dengan sumbu x adalah konsentrasi larutan uji, sedangkan sumbu y adalah persentase aktivitas peredaman radikal DPPH (% inhibisi). Nilai IC50 merupakan konsentrasi sampel untuk dapat meredam 50% aktivitas radikal DPPH.

### 3. Hasil dan Pembahasan

Penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam serbuk dan ekstrak etanol daun johan. Hasil penapisan fitokimia dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji penapisan fitokimia serbuk dan ekstrak etanol daun johan

Uji	Hasil	
	Serbuk	Ekstrak Etanol
Flavonoid	+	+
Alkaloid	+	+
Steroid	+	+
Triterpenoid	+	+
Saponin	+	+
Tanin	+	+
Kuinon	+	+

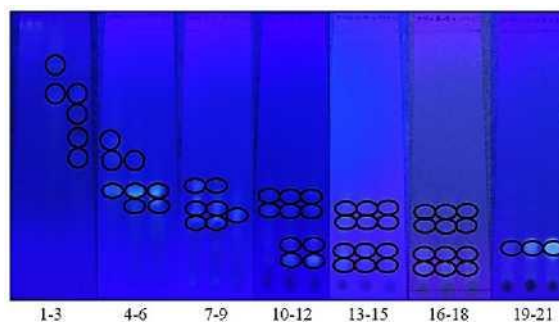
#### Isolasi Flavonoid

Serbuk daun johan sebanyak 1475 gram setelah dimaserasi dengan pelarut etanol 96%, disaring dan dievaporasi hingga diperoleh ekstrak kental etanol berwarna coklat kehitaman pekat sebanyak 133,33 gram (8,89%). Ekstrak kental etanol setelah dihilangkan klorofilnya menghasilkan fraksi etanol-air, kemudian difraksinasi menggunakan n-heksana. Fraksi etanol-air hasil fraksinasi dihidrolisis dengan metode refluks menggunakan HCl 2 N yang bertujuan untuk memutus ikatan O-glikosida pada kerangka flavonoid, sehingga terbentuk flavonoid bebas dan gula. Flavonoid bebas

dalam campuran dapat diambil dengan fraksinasi menggunakan etil asetat. Fraksi etil asetat diuapkan untuk menghilangkan pelarut dan didapatkan fraksi etil asetat sebanyak 7,95 gram (0,53%).

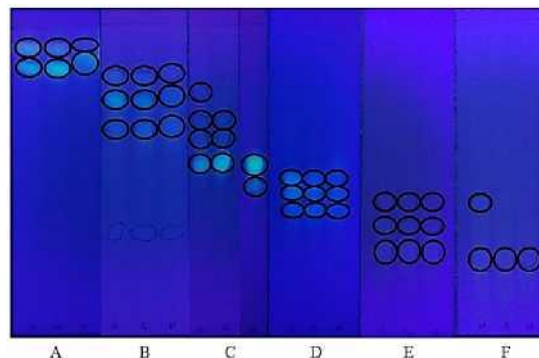
#### Pemisahan Flavonoid dan Uji Kemurnian

Pemisahan flavonoid pada fraksi etil asetat dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi cair vakum dengan fasa diam silika gel 60 GF254 dan fasa gerak berdasarkan gradien tingkat kepolaran, dimulai dari kloroform/etil asetat, etil asetat, dan etil asetat/etanol. Eluat yang dihasilkan sebanyak 21 botol vial, kemudian masing-masing botol vial dianalisis dengan KLT menggunakan fasa gerak kloroform: etil asetat (7:3) yang ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Profil KLT fraksi etil asetat daun johan dengan kromatografi cair vakum menggunakan fasa gerak kloroform: etil asetat (7:3) pada UV X 365 nm

Fraksi 10-21 digabung menjadi satu (Fraksi I) karena memiliki kemiripan pola noda dan juga menunjukkan positif flavonoid pada penampak bercak uap amoniak. Fraksi I dilakukan pemisahan flavonoid menggunakan kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5) dan fasa diam berupa silika gel 60 H. Eluat yang dihasilkan sebanyak 61 botol vial. Masing-masing botol vial tersebut dianalisis menggunakan KLT dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5). Hasil KLT diberi penampak bercak uap amoniak, yang mempunyai pola noda yang sama digabung dan diperoleh 6 fraksi besar yaitu fraksi A,B,C,D,E dan F seperti yang ditunjukkan pada gambar 2 dan tabel 2.

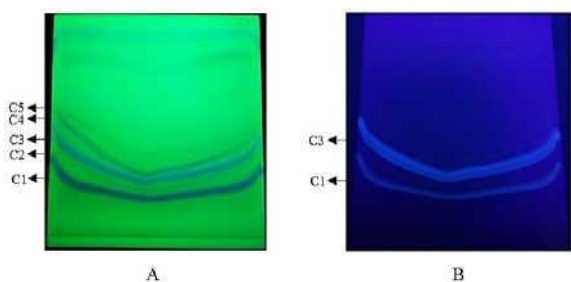


Gambar 2. Profil KLT fraksi I hasil kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform:etil asetat:butanol (7:2,5:0,5) pada UV X 365 nm

Tabel 2. KLT fraksi I hasil kromatografi kolom gravitasi dengan fasa gerak kloroform: etil asetat: butanol (7:2,5:0,5) pada UV X 365 nm

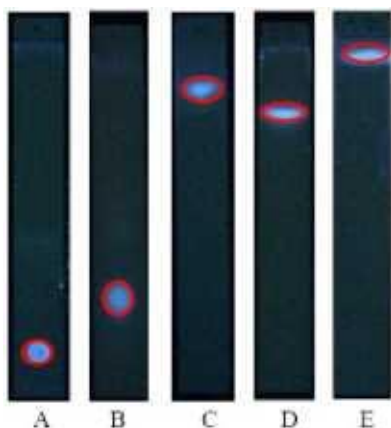
Fraksi	Jumlah Vial	Wujud dan Warna Fraksi	Jumlah Noda
A	1-14	Minyak (Bening)	2
B	15-19	Minyak (Kuning)	3
C	20-31	Minyak (Kuning Pekat)	5
D	32-37	Minyak (Kuning Pekat)	3
E	38-46	Minyak (Kuning)	3
F	47-61	Minyak (Kuning)	2

Fraksi A, B, C dan D menunjukkan positif flavonoid setelah diberi penampak bercak uap amoniak, namun fraksi C memberikan hasil flavonoid yang lebih dominan dan terlihat jelas dibandingkan fraksi-fraksi lainnya. Fraksi C selanjutnya dipisahkan menggunakan metode KLT preparatif dengan fasa diam plat silika gel 60 F254 ukuran 20 cm x 20 cm, ketebalan 0,5 mm-2,0 mm dan fasa gerak berupa campuran kloroform: metanol (9:1). Hasil KLT preparatif fraksi C ditampilkan pada gambar 3.



Gambar 3. Profil KLT preparatif fraksi C dengan fasa gerak kloroform: metanol (9:1) (A: pada UV X 254 nm ; B: pada UV X 365 nm)

Pita C3 selanjutnya dikerok, dilarutkan, dan disaring hingga didapat isolat flavonoid C3. Isolat flavonoid C3 diuji kemurniannya dengan berbagai eluen tunggal dan campuran seperti yang disajikan pada gambar 4.

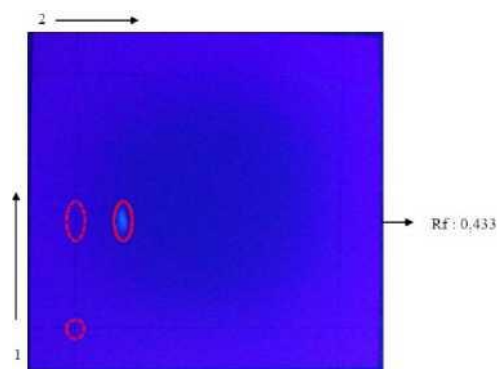


Keterangan: Fasa gerak (A) = kloroform, Fasa gerak (B) = etil asetat, Fasa gerak (C) = metanol, Fasa gerak

(D) = kloroform: metanol (9:1), Fasa gerak (E) = kloroform: Methanol (1:1)

Gambar 4. Profil KLT uji kemurnian isolat flavonoid C3 dengan berbagai fasa gerak pada UV X 365 nm

Uji kemurnian dilanjutkan menggunakan metode KLT dua dimensi seperti yang ditunjukkan pada gambar 5.



Gambar 5. Profil KLT dua dimensi pada uji kemurnian isolat flavonoid C3 dengan berbagai fasa gerak pada UV X 365 nm

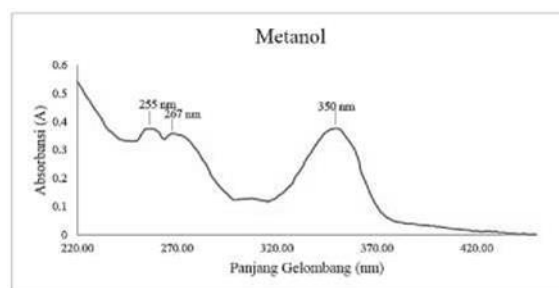
Keterangan:

1. Kloroform: metanol (9:1)
2. Kloroform: metanol (10:1)

Pada gambar 4 dan 5, terlihat hasil KLT menunjukkan noda tunggal. Hal ini diduga bahwa isolat flavonoid C3 telah murni. Noda pada KLT dua dimensi berwarna fluoresensi hijau kebiruan setelah diberi penampak bercak uap amoniak yang diduga isolat flavonoid C3 termasuk ke dalam flavonoid jenis flavon, flavonol atau flavanon, sesuai dengan tabel penafsiran warna bercak dari segi struktur flavonoid [7]. Isolat flavonoid C3 diuapkan dan diperoleh isolat flavonoid sebanyak 0,006 gram.

Identifikasi Struktur Flavonoid

Isolat flavonoid C3 dilarutkan dalam metanol, kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan diperoleh spektrum yang disajikan pada gambar 6.

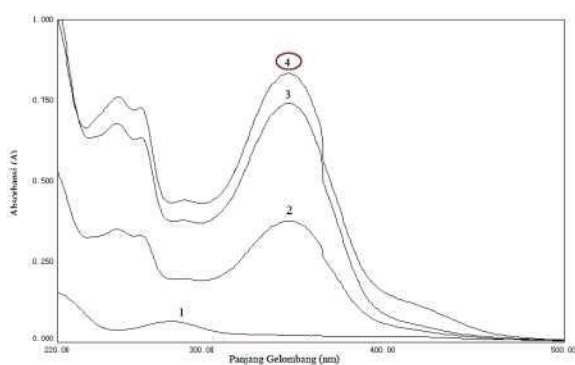


Gambar 6. Spektrum UV-Vis isolat flavonoid C3 dalam metanol

Isolat flavonoid C3 yang dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan tiga serapan panjang gelombang, yaitu pita I (350 nm) dan pita II (255 nm dan 267 nm). Pita I pada flavonoid



menunjukkan absorpsi pada cincin B sinamoil dan pita II adalah absorpsi cincin A benzoil. Menurut [7] dilihat dari spektrum yang diperoleh diduga isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa flavon, karena flavon memiliki rentang serapan pita I (310–350 nm) dan pita II (255–280 nm). Hal ini sesuai dengan hasil identifikasi awal menggunakan KLT dengan diberi uap amoniak. Menurut penelitian [1], jenis flavonoid yang terdapat pada daun johar (*Senna siamea* L.,) adalah luteolin, yang merupakan salah satu senyawa yang termasuk golongan flavon. Peneliti lain [8] telah melakukan penelitian mengenai luteolin yang juga dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Luteolin memiliki panjang gelombang pada pita I (348 nm) dan pita II (254 dan 266 nm). Spektrum isolat flavonoid C3 dibandingkan dengan spektrum senyawa luteolin menurut penelitian [8] yang dapat dilihat pada gambar 7 (spektrum UV-Vis nomor 4).



Gambar 7. Spektrum UV-Vis fosfolipid (1), campuran fisik luteolin dan fosfolipid (2), kompleks luteolin-fosfolipid (3), dan luteolin (4)[8]

Isolat flavonoid C3 memiliki kemiripan pola spektrum dan serapan panjang gelombang pada pita I dan pita II dengan senyawa luteolin hasil penelitian [8]. Oleh sebab itu dapat diduga bahwa isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa luteolin.

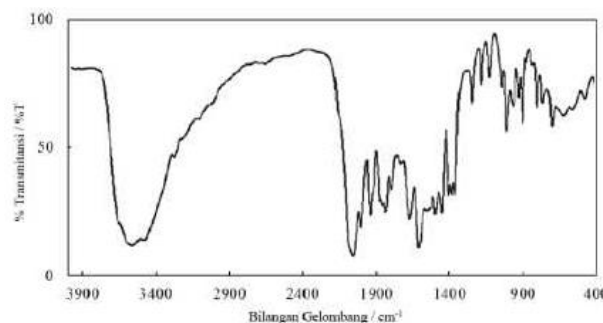
Isolat flavonoid C3 diidentifikasi menggunakan spektrofotometer inframerah untuk menunjukkan gugus fungsi yang terdapat pada isolat. Spektrum inframerah dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Spektrum Spektrum FTIR isolate flavonoid C3

Dari hasil analisis isolat flavonoid C3 memiliki pita serapan pada bilangan gelombang 3436,19  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya vibrasi ulur O-H yang dapat membentuk ikatan hidrogen. Pita serapan pada 2926,95  $\text{cm}^{-1}$  dan 2858,88  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya

vibrasi ulur C-H alifatik. Pita serapan pada bilangan gelombang 1737,71  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi ulur C=O dan pita serapan pada bilangan gelombang 1628,70  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi ulur C=C aromatik. Pita serapan pada bilangan gelombang 1166,00  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur C-O eter (jembatan O), pita serapan pada bilangan gelombang 1047,31  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan vibrasi ulur C-O alkohol dan pita serapan pada bilangan gelombang 849,88  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya vibrasi tekuk C-H keluar bidang yang menandakan adanya substitusi cincin aromatic [9]. Spektrum FTIR isolat flavonoid C3 dibandingkan dengan spektrum FTIR luteolin standar yang dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Spektrum FTIR luteolin standar

Spektrum FTIR luteolin standar menunjukkan adanya pita serapan pada 4307  $\text{cm}^{-1}$ , 1656  $\text{cm}^{-1}$ , 1610  $\text{cm}^{-1}$ , 1134  $\text{cm}^{-1}$ , dan 820  $\text{cm}^{-1}$ . Pita serapan pada 4307  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus O-H pada benzena, pita serapan pada 1656  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C=O, pita serapan pada 1610  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C=C aromatik, pita serapan pada 1134  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-O eter, pita serapan pada 1025  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-O alkohol dan pita serapan pada 820  $\text{cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H keluar bidang yang menandakan adanya substitusi cincin aromatik. Perbandingan bilangan gelombang dan gugus fungsi isolate flavonoid C3 dengan gugus fungsi luteolin standar dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan bilangan gelombang dan gugus fungsi isolat flavonoid C3 dengan gugus fungsi luteolin standar

Gugus Fungsi	Bilangan Gelombang Isolat Flavonoid C3 ( $\text{cm}^{-1}$ )	Bilangan Gelombang Luteolin Standar ( $\text{cm}^{-1}$ )
O-H ulur	3436,19	4307
-C-H ulur alifatik	2926,95, 2858,88	-
C=O ulur	1737,71	1656
C=C aroinatik	1628,70	1610
C-O eter (jembatan O)	1166,00	1134
C-O alkohol	1047,31	1025
C-H tekuk keluar bidang (substitusi benzena)	849,88	820

Hasil perbandingan antara spektrum FTIR isolat flavonoid C3 dengan spektrum FTIR luteolin standar

menunjukkan adanya satu perbedaan puncak serapan diantara keduanya. Pada spektrum FTIR isolat flavonoid C3 menunjukkan adanya pita serapan pada 2926,95 dan 2858,88  $\text{cm}^{-1}$  yang menunjukkan keberadaan gugus C-H alifatik, sedangkan pada spektrum FTIR luteolin standar tidak menunjukkan pita serapan pada bilangan gelombang tersebut. Dengan keberadaan gugus C-H alifatik tersebut diduga isolat flavonoid C3 memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi, akan tetapi posisi gugus O-H yang tersubstitusi tidak dapat diketahui sehingga struktur lengkap dari isolat flavonoid C3 belum dapat diajukan.

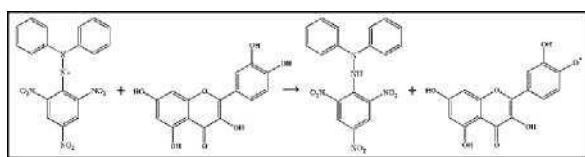
**Uji Aktivitas Antioksidan**

Hasil aktivitas antioksidan isolat flavonoid C3 yang dilakukan menggunakan KLT dengan fasa gerak campuran kloroform: metanol (9:1) menunjukkan perubahan warna dari ungu menjadi kuning pada noda yang ditunjukkan pada gambar 10.



Gambar 10. Hasil uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid C3 pada sinar tampak

Penentuan aktivitas antioksidan dilanjutkan dengan menggunakan metode DPPH (*1,1-difenil-2-pikrilhidrazil*) terhadap isolat flavonoid C3 dan kuersetin sebagai pembanding. Flavonoid akan menghambat aktivitas radikal bebas dari DPPH karena memiliki kemampuan untuk mendonorkan radikal protonnya yang akan menyebabkan terjadinya reduksi membentuk DPPH nonradikal. Reaksi peredaman radikal bebas oleh flavonoid yang mungkin terjadi dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Reaksi peredaman radikal bebas oleh flavonoid [10]

Parameter uji aktivitas antioksidan adalah *Inhibition Concentration (IC50)* yaitu konsentrasi suatu zat antioksidan yang menyebabkan 50% DPPH kehilangan karakter radikal atau konsentrasi suatu zat antioksidan yang memberikan persentase penghambatan sebesar 50%. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil perhitungan  $IC_{50}$  isolat flavonoid C3 dan kuersetin

Sampel	$IC_{50}$ (mg/L)
Isolat Flavonoid C3	139.8373

Hasil uji aktivitas antioksidan menunjukkan bahwa isolat flavonoid C3 memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah dari kuersetin. Harga  $IC_{50}$  yang baik yaitu di bawah 200 mg/L [11], oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa isolat flavonoid C3 memiliki aktivitas antioksidan. Tingginya aktivitas antioksidan pada kuersetin disebabkan kuersetin yang digunakan merupakan senyawa murni yang mempunyai kemampuan lebih besar untuk mendonorkan protonnya. Gugus hidroksil sangat berperan dalam meredam radikal bebas dengan cara mendonorkan protonnya.

**4. Kesimpulan**

Isolat flavonoid dari ekstrak etanol daun johar (*Senna siamea* Lamk) diperoleh sebesar 0,006 gram (0,004 %). Identifikasi isolat flavonoid daun johar menggunakan spektrofotometer UV-Vis dan FTIR menunjukkan bahwa isolat tersebut diduga memiliki struktur dasar senyawa luteolin yang tersubstitusi. Isolat flavonoid daun johar memiliki aktivitas antioksidan ditunjukkan oleh harga  $IC_{50}$  sebesar 139,8373 mg/L.

**5. Daftar Pustaka**

- [1] Mamadou Kamagaté, Camille Koffi, N'goran Mathieu Kouamé, Aminata Akoubet, N'guessan Alain Roland Yao, Henri Maxime Die-Kakou, Ethnobotany, phytochemistry, pharmacology and toxicology profiles of *Cassia siamea* Lam, *The Journal of Phytopharmacology*, 3, 1, (2014) 57-76
- [2] Lakshmi Narayana Majji, Ganga Rao Battu, Ravi Kumar Jangiti, Mallikarjun Rao Talluri, Evaluation of In-Vitro Antibacterial Activity of *Cassia Siamea* leaves, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 3, (2013) 263-265
- [3] P. Poovendran, N. Ramanathan, N. Prabhu, Evaluation of the Antibacterial Activity of *Aegle marmelos* and *Cassia siamea* Extracts Against Biofilm and Extended Spectrum-Lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli*, *International Journal of Microbiological Research*, 5, 3, (2014) 217-221 <http://dx.doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2014.5.3.9138>
- [4] S. Kumar, V. Kumar, Om Prakash, Antidiabetic and anti-lipemic effects of *Cassia siamea* leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 11, (2010) 871-873 [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60209-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60209-X)
- [5] Usha Veerachari, A. K. Bopaiah, Preliminary phytochemical evaluation of the leaf extract of five *Cassia* Species, *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 5, (2011) 574-583
- [6] K. Ingkaninan, A. P. Ijzerman, R. Verpoorte, Luteolin, a Compound with Adenosine A1 Receptor-Binding Activity, and Chromone and Dihydronaphthalenone Constituents from *Senna siamea*, *Journal of Natural Products*, 63, 3, (2000) 315-317 <http://dx.doi.org/10.1021/np9904152>
- [7] K. R. Markham, *Techniques of flavonoid identification*, Academic Press, 1982.

- [8] Keyong Xu, Benguo Liu, Yuxiang Ma, Jiquan Du, Guanglei Li, Han Gao, Yuan Zhang, Zhengxiang Ning, Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Luteolin-Phospholipid Complex, *Molecules*, 14, 9, (2009) 3486
- [9] Robert Milton Silverstein, Francis X. Webster, David J. Kiemle, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, John Wiley & Sons, 2005.
- [10] Amic Dragan, Davidovic-Amic Dusanka, Beslo Drago, Rastija Vesna, Lucic Bono, Trinajstic Nenad, SAR and QSAR of the Antioxidant Activity of Flavonoids, *Current Medicinal Chemistry*, 14, 7, (2007) 827-845  
<http://dx.doi.org/10.2174/092986707780090954>
- [11] Marsden S. Blois, Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, *Nature*, 181, (1958) 1199 <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>