

Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antioksidan Flavonoid dari Ekstrak Air Kulit Batang Ketapang Kencana (*Terminalia muelleri* Benth.)

Wiwit Wulan Yuniati, Khairul Anam, Dewi Kusriani
Jurusan Kimia FMIPA, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia
Email : k_anam@undip.ac.id

ABSTRAK

Telah diisolasi, karakterisasi dan uji aktivitas antioksidan senyawa flavonoid dari ekstrak air kulit batang tumbuhan Ketapang Kencana (*Terminalia muelleri* Benth.). Identifikasi jenis flavonoid dilakukan dalam lima tahap, tahap pertama adalah preparasi serta ekstraksi sampel menggunakan metode infudasi, tahap kedua, penapisan fitokimia serbuk ekstrak air, tahap ketiga, isolasi senyawa flavonoid meliputi pemisahan menggunakan kromatografi kolom, hidrolisis asam dan ekstraksi fraksi serta uji kemurnian isolat, tahap keempat, karakterisasi dan elusidasi isolat murni flavonoid hasil isolasi secara spektroskopi menggunakan spektrometer Infra merah (IR), spektrofotometer UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser, spektrometer $^1\text{H-NMR}$ serta $^{13}\text{C-NMR}$ dan tahap kelima yaitu uji aktivitas antioksidan isolat menggunakan metode DPPH. Isolat berupa serbuk kuning dengan rendemen 0,2% dan memiliki titik lebur 306-307,5 °C. Karakterisasi secara spektrometri menunjukkan bahwa isolat adalah Kuersetin. Uji aktivitas antioksidan isolat kuersetin memiliki nilai (IC₅₀) 257,23 ppm.

Keywords: *Terminalia muelleri* Benth., flavonoid, kuersetin, DPPH

PENDAHULUAN

Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar. Salah satu tumbuhan yang mengandung senyawa flavonoid adalah tumbuhan Ketapang Kencana (*Terminalia muelleri* Benth.) yang berasal dari famili *Terminalia* dan genus *Combretaceae*. Tanaman ini berasal dari Australia dan tersebar secara luas di daerah tropis seperti India, Indonesia, Malaysia, New Guini, dan Amerika Utara (Lemmens and Wulijarni-Soedjipto, 1992).

Kandungan kimia *T. muelleri* belum banyak diketahui. Sejauh ini yang dilaporkan adalah ekstrak buah dan daun *T. muelleri* memiliki aktivitas antioksidan dan senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas tersebut adalah asam elagat (Bajpai dkk., 2005). Anam dkk. (2009) melaporkan bahwa ekstrak heksana, etil asetat dan metanol dari daun *T. muelleri* bersifat sebagai antimikroba, Anam dkk. (2010) juga melaporkan bahwa senyawa yang bertanggung jawab sebagai antimikroba dari ekstrak etil asetat daun *T. muelleri* adalah asam galat.

METODOLOGI PENELITIAN

1. Bahan dan Alat

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit batang tumbuhan *Terminalia muelleri* Benth., sephadexTM LH-20 (GE 17-0090-01), plat KLT silika gel F60 (Merck-05554), kloroform (Merck), aquades, etanol (Merck), etil asetat (Merck), n-heksana (Merck), metanol (Merck), aseton (Merck), amoniak 25 % (Merck), aluminium klorida (AlCl₃) (Merck), natrium asetat (NaOAc) (Merck), asam borat (H₃BO₃) (Merck), asam klorida (HCl) pekat (Merck), natrium hidroksida (NaOH) (Merck) serta DPPH (Merck).

Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer 1 L, botol vial 25 mL, corong gelas, cawan penguap, pipet tetes, labu ukur 25 mL, kompor listrik, neraca analitik (Kern-870), chamber kromatografi lapis tipis (KLT), tabung kromatografi kolom, pengering freeze-dryer (Eyela D50), lampu UV (Spectroline ENF-24/F), spektrometer UV-Vis (Shimadzu-1601), spektrometer IR (Shimadzu tipe Prestige-21)

dengan pellet KBr, serta $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$ (JEOL Delta2- 500 MHz).

2. Cara Kerja

Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Kulit batang tumbuhan *Terminalia muelleri* Benth. diperoleh dan dideterminasi di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Bogor, kulit batang tersebut dibersihkan dari pengotornya, dikeringkan pada suhu kamar dan dijadikan serbuk menggunakan blender.

Sebanyak 500 gram serbuk kulit batang tumbuhan *Terminalia muelleri* Benth. diekstraksi dengan metode infudasi menggunakan pelarut aquades, disaring dan dipisahkan dari ampasnya. Filtrat yang didapatkan, diuapkan pelarutnya menggunakan freeze-dryer sehingga didapatkan serbuk ekstrak air kering.

Penapisan Fitokimia Serbuk Ekstrak Air

Serbuk ekstrak air kulit batang tumbuhan *Terminalia muelleri* Benth. diuji kandungan kimianya dengan cara penapisan fitokimia meliputi alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, kuinon, sterol dan terpenoid menggunakan metode yang dikembangkan oleh Farnsworth (1966).

Isolasi Senyawa Flavonoid

Serbuk ekstrak air yang positif mengandung flavonoid dipisahkan dengan metode kromatografi kolom dengan fasa diam sephadex LH-20 serta fasa gerak air metanol dengan menggunakan sistem gradien perbandingan kepolaran pelarut menurun.

Fractions yang menunjukkan warna dan pola noda serta R_f yang sama berdasarkan hasil pemantauan KLT, digabung dan ditentukan fraksi yang banyak mengandung flavonoid kemudian dipisahkan dan dihidrolisis menggunakan asam klorida (HCl), diekstraksi dengan etil asetat dan dipisahkan menggunakan corong pisah. Lapisan etil asetat yang didapat, diuapkan, dan dipantau menggunakan KLT dibawah lampu UV 254 dan 365 nm serta penampak bercak uap amoniak dan larutan AlCl_3 5% (dalam etanol).

Fractions etil asetat tersebut ditelaah kandungan kimianya menggunakan KLT dengan berbagai eluen yang berbeda dan menggunakan metode KLT dua dimensi. Bila diketahui hanya terdapat

satu noda, dikatakan bahwa fraksi etil asetat adalah isolat murni.

Karakterisasi Isolat Flavonoid

Isolat flavonoid hasil isolasi dikarakterisasi menggunakan UV-Vis dengan penambahan pereaksi geser (Markham, 1988), Infra Red, $^1\text{H-NMR}$ dan $^{13}\text{C-NMR}$.

Uji Aktivitas Antioksidan Isolat Flavonoid

Uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Uji aktivitas antioksidan isolat flavonoid secara kualitatif dilakukan dengan penyemprotan noda isolat flavonoid pada plat KLT yang telah dielusi, dengan larutan DPPH (dalam kloroform).

Aktivitas antioksidan isolat flavonoid secara kuantitatif ditentukan dengan menggunakan spektrometer UV-Vis dan dibandingkan dengan senyawa standar, vitamin C. Panjang gelombang larutan DPPH (dalam metanol) diukur untuk mencari absorbansi maksimumnya, dan digunakan sebagai panjang gelombang untuk mengukur absorbansi peredaman DPPH oleh isolat flavonoid ataupun asam askorbat. Absorbansi peredaman DPPH yang didapatkan dipakai untuk menghitung prosentase konsentrasi inhibisi (IC_{50}) melalui persamaan regresi linier yang diperoleh dengan cara mengkalikan prosentase penghambatan serapan pada berbagai konsentrasi sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi dan Ekstraksi Sampel

Kulit batang tumbuhan *T. muelleri* Benth. dibersihkan, dikeringkan dan dijadikan serbuk. Sebanyak 250 gram serbuk kulit batang *T. muelleri* Benth. diinfudasi selama 15 menit menggunakan penyari air kemudian disaring dan dihasilkan larutan yang berwarna coklat tua. Ekstrak air dikeringkan menggunakan freeze-dryer dan didapatkan serbuk ekstrak berwarna coklat sebanyak 14%.

Penapisan Fitokimia

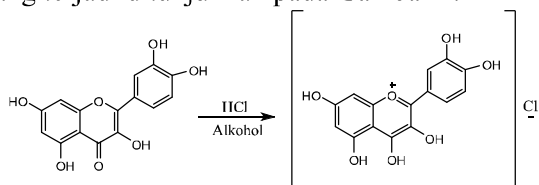
Serbuk kulit batang tumbuhan *T. muelleri* Benth. diuji kandungan metabolit sekundernya dengan menggunakan penapisan fitokimia yang meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, sterol dan terpenoid (Farnsworth, 1966). Hasil penapisan fitokimia serbuk kulit batang

tumbuhan *T. muelleri* Benth. ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil penapisan fitokimia ekstrak air kulit batang *T. muelleri* Benth.

| Jenis Metabolit Sekunder | Hasil Uji (+)/ (-) |
|--------------------------|--------------------|
| Alkaloid | Negatif (-) |
| Flavonoid | Positif (+) |
| Saponin | Positif (+) |
| Kuinon | Positif (+) |
| Tanin | Positif (+) |
| Steroid/ Terpenoid | Negatif (-) |

Hasil penapisan fitokimia memperlihatkan bahwa ekstrak air kulit batang *Terminalia muelleri* diduga mengandung senyawa flavonoid golongan flavonol. Flavonol yang direaksikan dengan asam mineral akan menghasilkan garam benzopirilium yang berwarna merah (Achmad, 1986). Reaksi yang terjadi ditunjukkan pada Gambar 1.



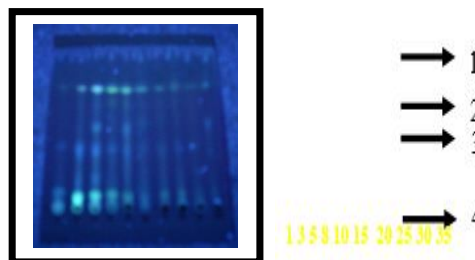
Gambar 1. Reaksi Pembentukan Garam Flavilium (Achmad, 1986).

Isolasi Senyawa Flavonoid

Serbuk ekstrak air dipisahkan menggunakan metode kromatografi kolom dengan fasa diam sephadex LH-20 dan fasa gerak dengan sistem gradien kepolaran menurun. Fasa gerak yang digunakan adalah air-metanol dengan perbandingan (9:1), (8:2), (7:3), (6:4), (5:5), (4:6), (3:7), (2:8), (1:9) dan (0:10). Eluat dari masing-masing perbandingan pelarut ditampung sebanyak 25 mL ke dalam 12 botol vial, sehingga didapatkan fraksi total sebanyak 120 botol vial. Fraksi-fraksi yang didapatkan, dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengembang (etil asetat: asam format: metanol =18:1:1) dan penampak bercak $AlCl_3$ 5% (dalam etanol).

Berdasarkan hasil pemantauan KLT, fraksi vial ke 1-35 diketahui banyak mengandung flavonoid serta memiliki Rf, warna dan pola noda yang sama dan ditunjukkan pada Gambar 2. selanjutnya Berdasarkan hasil pemantauan KLT, fraksi vial ke 1-35 diketahui banyak mengandung

flavonoid serta memiliki Rf, warna dan pola noda yang sama dan ditunjukkan pada Gambar 3.2. selanjutnya Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan KLT diketahui bahwa fraksi vial 1-35 digabung dan dipekatkan.



Gambar 2. Profil KLT vial ke 1-35 Hasil Kromatografi Kolom Ekstrak Air Kulit Batang *T. muelleri*.

Keterangan Noda: 1. Berwarna kuning (Rf: 0,83), 2. Berwarna biru kehijauan (Rf: 0,6), 3. Berwarna biru terang (Rf:0,5) dan 4. Berwarna kuning kecoklatan (Rf:0,12).

Fraksi pekat yang diperoleh dihidrolisis menggunakan asam klorida 2 M dan diekstraksi menggunakan etil asetat. Lapisan etil asetat yang didapatkan disebut sebagai fraksi etil asetat.

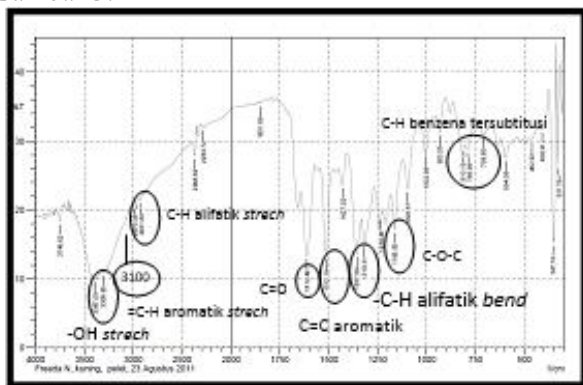
Fraksi etil asetat tersebut ditelaah kandungan kimianya menggunakan KLT silika gel dan penampak bercak $AlCl_3$ 5% dengan berbagai pengembang yang berbeda, yaitu kloroform-etil asetat (6:4) Rf: 0,3 ; metanol-heksana (7:3) Rf: 0,9 dan etanol-aseton (1:1) Rf: 0,6. Analisis menggunakan KLT dua dimensi dengan pengembang kloroform-etil asetat (6:4) dan metanol-heksana (7:3) juga menunjukkan adanya satu noda, sehingga dapat dipastikan bahwa fraksi etil asetat tersebut isolat flavonoid dan berupa serbuk kuning dengan rendemen 0,2% serta memiliki titik lebur 306-307,5 °C.

Karakterisasi Isolat Flavonoid

Isolat flavonoid dikarakterisasi menggunakan IR, UV-Vis dengan pereaksi geser, 1H -NMR dan ^{13}C -NMR.

Berdasarkan hasil analisis isolat flavonoid dengan menggunakan IR diketahui bahwa isolat murni flavonoid hasil isolasi gugus fungsi $-OH$ stretch (3387 cm^{-1} ; $3309,85\text{ cm}^{-1}$), $=C-H$ aromatik stretch (3100 cm^{-1}), C-H alifatik stretch ($2970,38\text{ cm}^{-1}$; $2931,80\text{ cm}^{-1}$), C=O ($1612,49\text{ cm}^{-1}$)

¹), C=C aromatik (1512,19 cm⁻¹), C-H alifatik bend (1427,32 cm⁻¹), C-O-C (1234,44 cm⁻¹), C-H keluar bidang (933,98 cm⁻¹) dan benzena tersubstitusi (810,10;786,96 cm⁻¹). Spektra IR isolat flavonoid tersebut ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 1. Spektrum IR isolat murni flavonoid.

Berdasarkan data IR dapat disimpulkan bahwa isolat tersebut memiliki gugus fungsi yang lazim ditemukan pada senyawa flavonoid. Selanjutnya untuk mengetahui jenis flavonoid isolat tersebut dilakukan karakterisasi dan elusidasi menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

Berdasarkan data UV-Vis diketahui bahwa terdapat dua serapan cahaya maksimum yaitu pada panjang gelombang 256,5 nm (pita II) dan 373,0 nm (pita I) yang diketahui sebagai flavonoid golongan flavonol dengan 3-OH bebas (Markham, 1988).

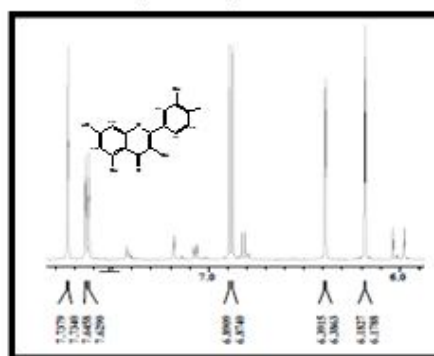
Penambahan pereaksi geser pada isolat murni flavonoid bertujuan untuk mengetahui letak gugus hidroksi pada flavonoid. Pereaksi geser yang digunakan antara lain: natrium hidroksida (NaOH), alumunium klorida (AlCl₃), asam klorida (HCl), natrium asetat (NaOAc) dan asam borat (H₃BO₃). Pergeseran yang terjadi serta penafsirannya ditunjukkan pada Tabel 2.

| Pelarut/ Pereaksi | λ maks. (nm) | | Pergeseran (nm) | | Penafsiran |
|----------------------|--------------|---------|-----------------|---------|----------------|
| | Pita I | Pita II | Pita I | Pita II | |
| MeOH | 373 | 256,5 | - | - | Flavonol |
| NaOH | 330 | - | -43 | - | 3-OH |
| NaOH 5menit | 327,5 | 220 | -45,5 | -36,5 | 3,4'- diOH |
| AlCl ₃ | 454 | 273 | +81 | +27 | Pengurai an |

| | | | |
|--|----------------|-------------------|---|
| AlCl ₃ + HCl | 327,5 220 | -45,5 -36,5 | 3- dan 5- OH serta o-OH pada cincin B |
| NaOAc | 380,5 257,5 | +7,5 +1 +16 +9 | o-OH pada cincin B |
| NaOAc+ H ₃ BO ₃ | 389 260,5 | | o-OH pada cincin B |
| | | | 7-OH |
| | | | o-OH pada cincin B |

Berdasarkan data hasil analisis menggunakan IR dan UV dihipotesiskan senyawa flavonoid yang berhasil di isolasi dari kulit batang *Terminalia muelleri* adalah 3,5,7,3',4' pentahidroksiflavan.

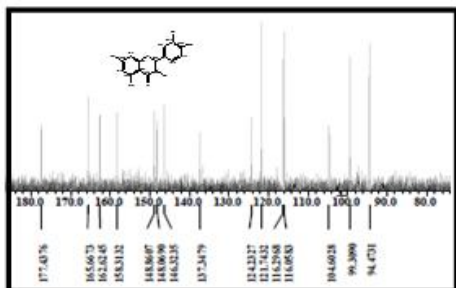
Data spektra ¹H-NMR isolat flavonoid dalam pelarut metanol menunjukkan adanya pergeseran kimia dari proton-proton pada isolat flavonoid, dan menunjukkan dua resonansi yang berbeda. yaitu 6,18 (1H, d, J= 1,95 Hz; H-6); 6,39 (1H, d, J= 2,6 Hz; H-8); 6,89 (1H, d, J= 8,45 Hz; H-2'); 7,63 (1H, d, J= 8,4 Hz; H-5'); dan 7,73 (1H, d, J=1,95 Hz; H-6'). Spektra ¹H-NMR isolat flavonoid tersebut ditunjukkan pada Gambar 4.



Gambar 4. Spektra Spektra ¹H-NMR isolat flavonoid..

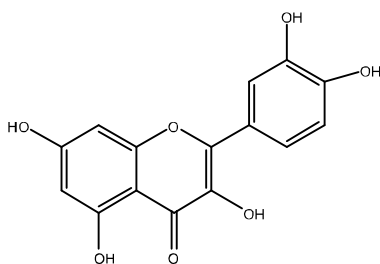
Data spektra menggunakan spektrometer ¹³C-NMR dalam pelarut metanol diketahui bahwa isolat flavonoid memiliki pergeseran kimia atom karbon 148,8607 ppm (C-2); 137,3479 ppm (C-3); 177,4376 ppm (C-4); 162,6245 ppm (C-5); 99,3090 ppm (C-6); 165,6673 ppm (C-7); 94,4731 ppm (C-8); 158,3132 ppm (C-9);

104,6028 ppm (C-10); 124,2327 ppm (C-2'); 116,0583 ppm (C-3'); 146,3235 ppm (C-4'), 148,0690 ppm (C-5'), dan 116,2968 ppm (C-6'). Spektre ¹³C-NMR ditunjukkan pada Gambar 5.



Gambar 5. Spektre ¹³C-NMR isolat flavonoid.

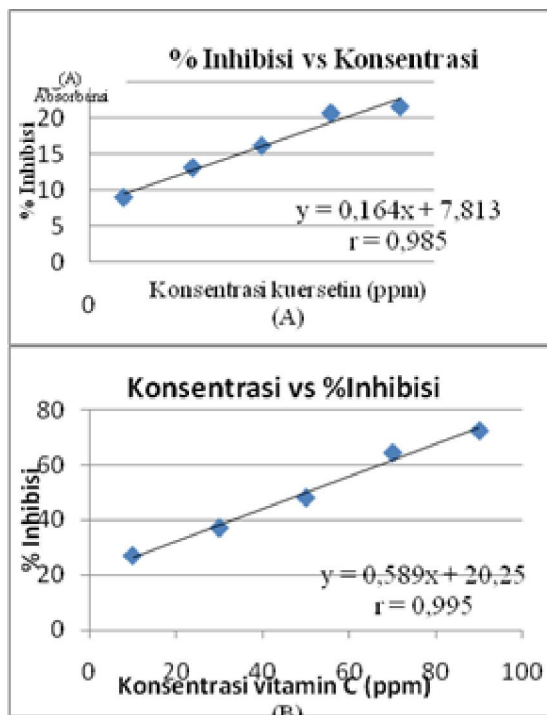
Berdasarkan data analisis IR, UV-Vis, ¹H-NMR dan ¹³C-NMR dipastikan isolat adalah isolat kuersetin.



Gambar 6. Struktur Senyawa Kuersetin (Harbone *et. al.*, 1982).

Uji Antioksidan

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan dengan uji DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrasil) terhadap isolat kuersetin dengan senyawa pembanding vitamin C. Uji DPPH digunakan untuk menentukan konsentrasi inhibisi (IC₅₀) yang dinyatakan dalam total antioksidan yang diperlukan untuk meredam 50% aktivitas radikal DPPH. Zat yang mempunyai aktivitas antioksidan tinggi memiliki harga IC₅₀ yang rendah. Pengukuran dapat dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (Ahmad dkk., 2006). Hasil uji DPPH dengan isolat kuersetin dan vitamin C ditunjukkan pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva peredaman DPPH dengan isolat kuersetin (A) dan vitamin C (B)

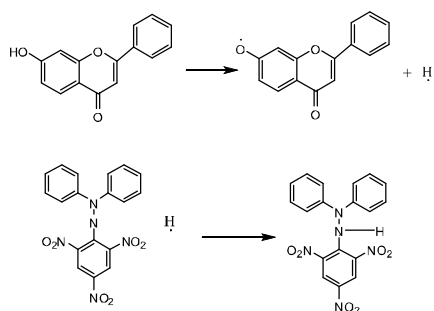
Nilai IC₅₀ kuersetin dan vitamin C diperoleh dari perpotongan garis antara 50% daya inhibisi dengan konsentrasi sampel. Perbandingan nilai IC₅₀ kuersetin dan vitamin C ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Perbandingan harga IC₅₀ kuersetin hasil isolasi dari kulit batang *T. muelleri* dengan vitamin C.

| Senyawa | Persamaan garis | Nilai IC ₅₀ (ppm) |
|-----------|----------------------------------|------------------------------|
| Kuersetin | y = 0,164 x + 7,813 r = 0,985 | 257,23 |
| Vit.C | y = 0,589 x + 20,25 r = 0,995 | 50,51 |

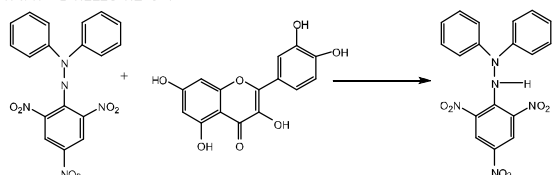
Aktivitas antioksidan isolat kuersetin hasil isolasi (IC₅₀) 257,23 ppm, hal ini menunjukkan bahwa kuersetin hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan yang lebih rendah dibandingkan dengan vitamin C, sehingga perlu dilakukan telaah lebih lanjut.

Mekanisme peredaman DPPH oleh flavonoid (7-flavanon) ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme peredaman DPPH oleh flavonoid (7-flavanon)

Berdasarkan mekanisme yang terjadi pada 7-flavanon, maka dapat dihipotesiskan mekanisme peredaman DPPH oleh kuersetin dan ditunjukkan pada Gambar 9.



Gambar 9. Mekanisme peredaman DPPH oleh kuersetin.

KESIMPULAN

Telah berhasil diisolasi senyawa flavonoid dari ekstrak air kulit batang *Terminalia muelleri* Benth. berupa serbuk berwarna kuning dengan rendemen 0,2% dan memiliki titik lebur 306-307,5 °C. Karakterisasi isolat yang dilakukan dengan menggunakan spektrometer UV-Vis, IR serta ¹H-NMR dan ¹³C-NMR menunjukkan bahwa isolat tersebut adalah Kuersetin. Kuersetin hasil isolasi memiliki aktivitas antioksidan (IC₅₀) 257,23 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Achmad, S.A., 1986, *Buku Materi Pokok Kimia Organik Bahan Alam*, Jakarta: Penerbit Karunika Jakarta Universitas Terbuka, 53-56.
- [2] Anam, K., A.G. Suganda, E.,Y. Sukandar and L.B.S. dan Kardono, 2009, Antimicrobial Activity of *Terminalia muelleri* Benth. leaves. Indonesia, *J. Nad. Prod.*, 7: 40-43.
- [3] Anam, K., Suganda, A.G.,Sukandar E.Y., danKardono, L.B.S., 2010, Antibacterial Effect of Component of *Terminalia muelleri*

Benth. Against *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Pharmacol.*, 6 (4), 369-374

- [4] Bajpai, M., Pande, A., Tewari, SK., danPrakash, D., 2005, Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Some Food and Medicinal Plants, *Int J. Food SciNutr.*, 56 (4), 287-91
- [5] Fransworth, N.R., 1966, Biological and Phytochemical Screening of Plants, *J. Pharm. Sci.*, 55, 245-265.
- [6] Lemmens, R.H.M.J. and N. Wulijarni-Soetjipto, 1992, *Prosea: Plant Resource of South-East Asia*. Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp:23.