

JURNAL ILMIAH

PENETAPAN KADAR FENOLIK DAN FLAVONOID TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN MERAH
KASTUBA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch)



Oleh
KHOLISATUN NAFILA AZ-ZAHRO
K1A019032

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS MATARAM
MATARAM
2023

**PENETAPAN KADAR FENOLIK DAN FLAVONOID TOTAL
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN MERAH
KASTUBA (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch)**

**Kholisatun Nafila Az-Zahro, Rizqa Fersiyana Deccati, Lina Permatasari, Nisa Iseni
Hanifa**

ABSTRACT

Poinsettia (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) is a plant from the *Euphorbiaceae* family which is used as a wound healer, toothache medicine, antioxidant, and antibacterial. The poinsettia has red and green leaves. Previous research reported that antioxidant activity using the DPPH method on the ethyl acetate fraction of 96% ethanol extract of red poinsettia leaves had an IC₅₀ value of 13,67 ppm and was classified as a very strong antioxidant. Antioxidant activity related to secondary metabolites such as phenolics and flavonoids. However, the levels of total phenolic and flavonoid compounds in poinsettia leaves are unknown. The purpose of this study was to determine the total phenolic and total flavonoid content of the ethyl acetate fraction of the ethanol extract of poinsettia leaves. The red poinsettia leaves are extracted by maceration with 96% ethanol solvent and fractionated with ethyl acetate and water then screened for phytochemicals with a test tube and thin layer chromatography (TLC). The total phenolic and total flavonoid content of the ethyl acetate fraction of the ethanol extract of red poinsettia leaves obtained were respectively 480,7 ± 4,9 mg GAE/g fraction and 141,9 mg ± 6,1 mg QE/g fraction.

Key words : *Euphorbia pulcherrima* Willd., total phenolic, total flavonoid, spectrophotometer UV-Vis.

ABSTRAK

Kastuba (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch) merupakan tanaman dari family *Euphorbiaceae* yang bermanfaat sebagai penyembuh luka, obat sakit gigi, antioksidan, dan antibakteri. Tanaman kastuba memiliki daun yang berwarna merah dan hijau. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa aktivitas antioksidan dengan metode DPPH pada fraksi etil asetat ekstrak etanol 96% daun merah kastuba memiliki nilai IC₅₀ sebesar 13,67 ppm dan tergolong antioksidan sangat kuat. Aktivitas antioksidan berkaitan dengan metabolit sekunder seperti fenolik dan flavonoid. Namun kandungan senyawa fenolik dan flavonoid total pada daun merah kastuba belum diketahui kadarnya. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kadar fenolik total dan flavonoid total pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba. Daun merah kastuba diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96% dan dilakukan fraksinasi dengan pelarut etil asetat dan air, selanjutnya diskriminasi fitokimia dengan uji tabung dan kromatografi lapis tipis (KLT). Penetapan kadar fenolik total dan flavonoid total dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kadar fenolik total dan flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba yang diperoleh berturut-turut sebesar 480,7 ± 4,9 mg EAG/g fraksi dan 141,9 mg ± 6,1 mg EK/g fraksi.

Kata kunci : *Euphorbia pulcherrima* Willd., fenolik total, flavonoid total, spektrofotometer UV-Vis.

PENDAHULUAN

Radikal bebas adalah molekul atom yang pada orbital luarnya terdapat satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya. Radikal bebas dapat bersumber diantaranya dari paparan sinar matahari, asap rokok, polusi udara, dan obat-obatan tertentu. Tingginya paparan radikal bebas terhadap tubuh dapat berdampak stress oksidatif yang kemudian memicu kerusakan pada membran sel, mutasi dini DNA sel, serta penumpukkan lemak. Stress oksidatif yang meluas pada biomolekul karena radikal bebas dapat menjadi penyebab berbagai penyakit degeneratif seperti kanker, katarak, penyakit jantung koroner, dan diabetes (Parwata, 2016).

Antioksidan merupakan senyawa yang dapat meredam efek radikal bebas dengan cara menghentikan reaksi berantai radikal bebas di dalam tubuh (Murray *et al.*, 2009). Antioksidan dapat menyumbangkan elektronnya kepada radikal bebas sehingga radikal bebas menjadi stabil dan tidak reaktif lagi (Suhartono, 2002). Terdapat antioksidan sintetis dan alami. Penggunaan jangka panjang antioksidan sintetis seperti vitamin C dapat menyebabkan diare dan batu ginjal jika dikonsumsi lebih dari 2 gram/hari (Pacier & Martirosyan, 2015). Antioksidan sintetis lainnya seperti BHT (*Butil Hidroksi Toluen*) dan BHA (*Butil Hidroksi Anisol*) penggunaan dalam jangka panjang dapat memicu terjadinya

karsinogenesis (Ito *et al.*, 1983). Oleh karena itu dibutuhkan alternatif antioksidan yang lebih minim efek samping dan aman penggunaan jangka panjangnya yaitu antioksidan alami.

Kebutuhan antioksidan alami didukung oleh keanekaragaman hayati di Indonesia. Salah satu sumber antioksidan alami dan potensial adalah tanaman kastuba (*Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch). Pemanfaatan tradisional tanaman kastuba dijumpai pada masyarakat Desa Timbanuh, Kecamatan Pringgasele, Kabupaten Lombok Timur sebagai obat sakit gigi dan sayuran. Tanaman kastuba juga dimanfaatkan sebagai penyembuh luka yang paling diminati dengan skor *preference ranking* tertinggi yaitu 211 (Ibrahim *et al.*, 2019).

Penelitian oleh Sopiah *et al* (2019) melaporkan bahwa ekstrak etanol daun merah dan daun hijau kastuba yang diskriminasi fitokimia dengan menggunakan uji tabung dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) memiliki senyawa flavonoid, tanin, dan terpenoid. Adapun pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba terdapat senyawa fenolik, flavonoid, tanin, dan terpenoid (Emilga, 2022). Aktivitas antioksidan ekstrak etanol 96% daun merah kastuba dengan metode DPPH dilaporkan memiliki nilai IC_{50} sebesar 79,77 ppm dan tergolong antioksidan kuat, sedangkan pada ekstrak etanol daun hijau kastuba memiliki nilai IC_{50} sebesar 118,350 ppm yang tergolong antioksidan sedang (Sopiah *et al.*, 2019), sedangkan aktivitas

antioksidan pada tingkat fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba dengan metode DPPH dilaporkan memiliki nilai IC_{50} sebesar 13,67 ppm dan tergolong antioksidan sangat kuat (Emilga, 2022).

Penelitian oleh Emilga (2022) sebelumnya terbatas hanya pada uji aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba dan belum diteliti mengenai kadar fenolik dan flavonoid total pada fraksi tersebut, sedangkan terdapat hubungan yang linear antara kadar fenolik dan flavonoid total terhadap aktivitas antioksidan. Semakin tinggi kadar fenolik total suatu tanaman, maka semakin tinggi pula aktivitas antioksidannya (Wardani *et al.*, 2020). Flavonoid merupakan senyawa yang tergolong ke dalam fenolik, keduanya dapat berperan sebagai antioksidan melalui kemampuannya dalam mendonorkan atom hidrogen, karena memiliki gugus hidroksi ($-OH$) pada cincin aromatiknya, sehingga dapat menstabilkan radikal bebas (Kandaswami, 1997). Oleh karena itu penelitian mengenai penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ini penting dilakukan mengingat banyak sekali manfaat fenolik dan flavonoid terutama sebagai antioksidan alami dan sebagai data penelitian, pengembangan sediaan dari bahan alam, serta mempertegas potensi daun merah kastuba sebagai antioksidan alami melalui parameter kadar fenolik dan flavonoid total. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total dapat dilakukan dengan menggunakan instrument spektrofotometer

UV-Vis. Spektrofotometer UV-Vis dapat digunakan untuk analisis banyak zat organik dan anorganik, mempunyai ketelitian yang tinggi dengan kesalahan relatif sebesar 1—3%, analisis dapat dilakukan dengan tepat dan cepat, selektif, sederhana untuk menetapkan kuantitas zat yang sangat kecil, hasil yang diperoleh cukup akurat, angka yang terbaca langsung dicatat oleh detektor dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik yang sudah diregresikan (Yahya, 2013).

METODE PENELITIAN

1. Pengumpulan Sampel dan Determinasi Tanaman

Sampel tanaman berupa daun merah kastuba diperoleh dari Desa Sembalun, Kabupaten Lombok Timur, NTB dikumpulkan sebanyak ± 4 kg. Determinasi dilakukan di Laboratorium Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan (FKIP), Universitas Mataram.

2. Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia dimulai dengan proses sortasi basah daun merah kastuba, dirajang dengan ukuran 2—3 cm menggunakan gunting, dan diletakkan di wadah untuk proses pengeringan dengan metode kering angin. Daun merah kastuba yang telah kering, disortasi kering, diblender hingga terbentuk serbuk simplisia, ditimbang, diayak dengan mesh 40.

3. Ekstraksi

Ekstraksi dengan metode maserasi, 100 gram diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 1000 mL (perbandingan simplisia : pelarut = 1:10) dalam wadah kaca tertutup rapat di tempat yang terlindung dari cahaya matahari.

Ekstraksi dilakukan selama 24 jam dan larutan diaduk setiap 1 jam pada 6 jam. Remaserasi dilakukan sebanyak 2x.

4. Fraksinasi

Fraksinasi ekstrak etanol daun merah kastuba dilakukan dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah dengan 2 pelarut yang kepolarannya berbeda yaitu air dan etil asetat. Ekstrak kental yang diperoleh dari proses ekstraksi sebelumnya, diambil sebanyak 5 g dan dilarutkan dalam 50 mL air, ditambahkan dengan 50 mL pelarut etil asetat dalam corong pisah, dikocok kuat dan didiamkan sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan yang terbentuk dipisah (lapisan atas etil asetat dan lapisan bawah air). Prosedur di atas direplikasi sebanyak 2 kali. Fraksi etil asetat dari 3 kali partisi diambil dan dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 40°C, dilanjutkan dengan *waterbath* 40°C, hingga diperoleh fraksi etil asetat kental, lalu dihitung rendemen fraksinya

5. Skrining Fitokimia

a. Uji tabung

➤ Fenolik

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan FeCl₃ 5% 3 tetes. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman menunjukkan adanya senyawa fenolik (Raaman, 2006).

➤ Flavonoid

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan, kemudian ditambahkan 2

mg serbuk magnesium (Mg) dan larutan HCl 37% 3 tetes. Perubahan warna menjadi kuning, jingga, atau merah menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Harborne, 1987).

➤ Tanin

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan FeCl₃ 1% sebanyak 3 tetes. Sampel dinyatakan positif tanin apabila terbentuk warna hijau kehitaman (Harborne, 1987).

➤ Terpenoid

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan reagen *Lieberman-Burchard* (1 tetes asam asetat anhidrat dan 2 tetes asam sulfat pekat). Sampel dinyatakan positif tanin apabila terbentuk warna jingga (Harborne, 1987).

➤ Saponin

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 mL akuades, dikocok kuat selama 30 detik. Positif saponin jika terbentuk

busa dan tidak hilang selama minimal 30 detik (Marliana *et al.*, 2005).

b. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

➤ Fenolik

Menggunakan pembanding asam galat dengan fase gerak Metanol:Klorofom=2:8 dan disemprot FeCl_3 10%.

➤ Flavonoid

Menggunakan standard pembanding kuersetin dengan fase gerak Klorofom: Etil asetat: Butanol=5:3,5:0,5 dan disemprot AlCl_3 10%.

6. Penetapan Kadar Fenolik Total

Penetapan kadar fenolik total dilakukan dengan metode *Folin-Ciocalteu* berdasarkan prosedur Andriani & Murtisiwi (2018) dengan modifikasi.

➤ **Penentuan *Operating Time***

Larutan asam galat konsentrasi 30 ppm. ppm diambil sebanyak 0,3 mL, ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 3 menit. Campuran larutan ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, dikocok hingga homogen, dan diukur absorbansinya selama 0—120 menit dalam selang waktu 1 menit pada panjang gelombang maksimum teoritis 765 nm.

➤ **Panjang Gelombang Maksimum**

Larutan asam galat dengan konsentrasi 30 ppm diambil

sebanyak 0,3 mL ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin Ciocalteu*, kemudian dikocok dan diinkubasi selama 3 menit. Larutan tersebut ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, dihomogenkan, dan diinkubasi selama *operating time* yang diperoleh sebelumnya, lalu diukur absorbansinya pada panjang gelombang 600-850 nm.

➤ **Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Asam Galat (Pembuatan Kurva baku asam galat)**

Larutan asam galat diencerkan menjadi larutan seri konsentrasi 10, 20, 30, 40, 50 ppm. Masing-masing larutan seri dipipet sebanyak 0,3 mL, ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin Ciocalteu*, dikocok, dan diinkubasi selama 3 menit. Masing-masing larutan ditambahkan 1,2 mL larutan Na_2CO_3 7,5%, dihomogenkan, dan diinkubasi pada *operating time* yang diperoleh. Semua larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum. Dibuat kurva kalibrasi konsentrasi asamgalat (ppm) terhadap absorbansi. Prosedur di atas direplikasi sebanyak 3 kali.

➤ **Penentuan Kadar Fenolik Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Merah Kastuba**

Larutan sampel 100 ppm dipipet sebanyak 0,3 mL dan ditambahkan 1,5 mL reagen *Folin-Ciocalteu*, dihomogenkan, kemudian diinkubasi selama 3 menit, dan ditambahkan 1,2 mL larutan

Na₂CO₃ 7,5%. Campuran larutan diinkubasi pada *operating time* pada suhu kamar. Absorbansi larutan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Prosedur di atas direplikasi sebanyak 3 kali.

7. Penetapan Kadar Flavonoid Total

Penetapan kadar flavonoid total dilakukan dengan metode kolorimetri aluminium klorida berdasarkan prosedur Hadi (2022) dengan modifikasi.

➤ Pembuatan Larutan Induk Kuersetin 1000 ppm

Serbuk kuersetin ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan etanol p.a secukupnya hingga larut, dimasukkan ke labu ukur 10 mL dan ditambahkan etanol p.a sampai tanda batas.

➤ Penentuan Panjang Gelombang Maksimum

Larutan kuersetin berkonsentrasi 30 ppm diambil sebanyak 0,5 mL. Larutan kemudian direaksikan dengan 0,10 mL AlCl₃10%, ditambahkan 0,10 mL larutan natrium asetat 1 M dan 2,80 mL akuades. Larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 400—500 nm. Panjang gelombang maksimum ditunjukkan oleh nilai absorbansi tertinggi.

➤ Penentuan *Operating Time*

Larutan kuersetin 30 ppm diambil sebanyak 0,5 mL. Larutan kemudian direaksikan dengan 0,10 mL AlCl₃ 10%, ditambahkan 0,1 mL larutan natrium asetat 1 M dan 2,80 mL akuades. Campuran larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh dengan rentang waktu 0—60 menit dalam selang waktu 1 menit sampai diperoleh nilai absorbansi yang stabil.

➤ Pembuatan Kurva Baku

Kuersetin

Larutan intermediet kuersetin diencerkan menjadi larutan seri konsentrasi 20, 30, 40, 50, 60, dan 70 ppm. Larutan seri masing-masing dipipet sebanyak 0,5 mL, ditambahkan 0,10 mL AlCl₃ 10%; 0,10 mL natrium asetat 1 M dan 2,80 mL akuades. Larutan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Semua larutan seri diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dan direplikasi 3 kali, lalu ditentukan persamaan regresinya melalui kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi kuersetin dengan absorbansi.

➤ **Penentuan Kadar Flavonoid Total Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Merah Kastuba**

Larutan sampel 200 ppm dipipet sebanyak 0,5 mL, dimasukkan ke dalam vial, ditambahkan 0,10 mL $AlCl_3$ 10%, 0,10 mL natrium asetat 1 M dan 2,80 mL akuades. Larutan diinkubasi selama *operating time* pada suhu kamar. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Prosedur diatas direplikasi sebanyak 3 kali.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Hasil Determinasi

Berdasarkan surat hasil determinasi nomor 1959/UN.F5/J3.4.PP/2023 spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan (FKIP) Universitas Mataram adalah *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex Klotzsch.

2. Hasil pembuatan simplisia

Daun merah kastuba yang diperoleh dari tahap sortasi basah pada penelitian ini sebanyak 1,375 kg. Daun merah kastuba kemudian dikeringkan sampai kecoklatan dan membutuhkan waktu 14 hari. Daun merah kastuba yang telah kering diperoleh sebanyak 191,694 gram. Persen rendemen simplisia berdasarkan berat kering dan berat basahnya yaitu 13,94%.

Adapun kadar air simplisia yang terukur yaitu sebesar 8,36% dan telah memenuhi syarat kadar air simplisia yang baik yaitu <10% (Depkes RI, 2017).

3. Hasil Ekstraksi

Hasil dari proses ekstraksi yaitu ekstrak cair yang kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* dan dilanjutkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 24,4 gram dan persen rendemennya sebesar 24,4%. Persen rendemen ekstrak yang diperoleh dikatakan baik, karena memenuhi persyaratan yaitu tidak kurang dari 7,2% (Depkes RI, 2008).

4. Hasil Fraksinasi











Tabel Hasil fraksinasi daun merah kastuba

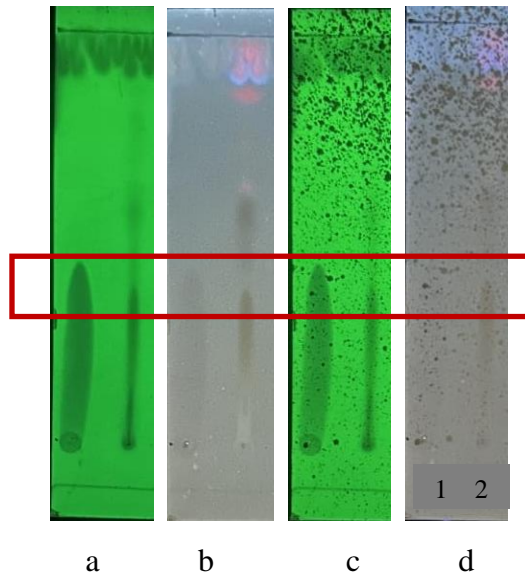
| Fraksi | Warna | Berat (g) | Persen rendemen (%) |
|-------------|------------------|-----------|---------------------|
| Etil asetat | Hijau kecoklatan | 1,46 | 29,2 |
| Air | Ungu kehitaman | 3,54 | 70,8 |

5. Skrining Fitokimia Fraksi Etil Asetat

Skrining dengan uji tabung menunjukkan hasil positif fenolik, flavonoid, tanin, dan terpenoid. Untuk memastikan uji tabung fenolik dan flavonoid dilakukan uji KLT. Hasil uji tabung terlihat pada Tabel berikut ini

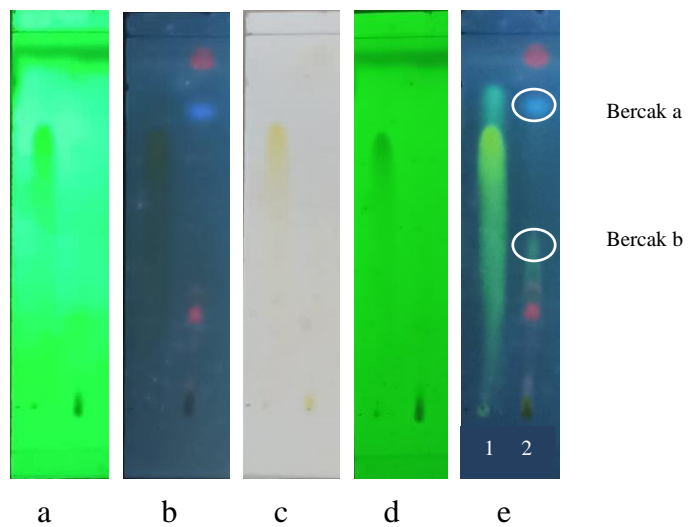
Tabel Hasil skrining fitokimia dengan uji tabung

| Identifikasi Senyawa | Pereaksi | Kontrol sampel | Sampel | Interpretasi |
|-----------------------------|---|---|---|---|
| Fenolik | FeCl ₃ 5% sebanyak 3 tetes |  |  | Positif fenolik ditandai warna hijau kehitaman |
| Flavonoid | 2 mg serbuk Magnesium (Mg) + 3 tetes HCl 37% |  |  | Positif flavonoid ditandai warna merah |
| Tanin | FeCl ₃ 1% sebanyak 3 tetes |  |  | Positif tanin ditandai warna hijau kehitaman |
| Terpenoid | Asam asetat anhidrat 1 tetes dan asam sulfat pekat 2 tetes |  |  | Positif terpenoid ditandai warna jingga |
| Saponin | 10 mL Akuades dikocok kuat selama 30 detik |  |  | Hasil positif ditandai adanya busa dan bertahan selama minimal 30 detik |



Gambar Profil KLT kandungan fenolik

- (a) dibawah sinar UV 254 nm setelah dielusi; (b) dibawah sinar UV 366 nm setelah dielusi; (c) dibawah sinar UV 254 nm Setelah disemprot FeCl_3 10%; (d) dibawah 366 nm Setelah disemprot FeCl_3 10%; (1) standar asam galat; (2) sampel fraksi etil asetat daun merah kastuba



Gambar 4 Profil KLT kandungan flavonoid

- (a). dibawah sinar UV 254 nm setelah dielusi; (b) dibawah sinar UV 366 nm setelah dielusi; (c) dibawah sinar tampak setelah disemprot AlCl_3 10%; (d) dibawah UV 254 nm setelah disemprot AlCl_3 10%; (e) dibawah UV 366 nm setelah disemprot AlCl_3 10%; (1) standar kuersetin; (2) sampel fraksi etil asetat daun merah kastuba.

6. Hasil Penetapan Kadar Fenolik Total

Tabel Hasil penetapan kadar fenolik total fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba

| Sampel | Berat sampel (g) | Absorbansi | Kadar fenolik total (mg EAG/g fraksi) | $\bar{x} \pm SD$ (mg EAG/g fraksi) | CV (%) |
|--------|------------------|------------|---------------------------------------|------------------------------------|--------|
| R1 | 0,0100 | 0,7039 | 486,0 | | |
| R2 | 0,0100 | 0,7104 | 482,0 | 480,7±4,9 | 1,02 |
| R3 | 0,0100 | 0,7227 | 474,0 | | |

Standar yang digunakan untuk penetapan kadar fenolik total pada penelitian ini adalah asam galat. Asam galat dipilih karena stabil dan murni. *Operating time* (OT) asam galat yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 95 menit. OT yang diperoleh tidak jauh berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Chun *et al.*, (2003) yaitu 90 menit. OT yang diperoleh digunakan untuk inkubasi standar dan diperoleh panjang gelombang maksimum asam galat 757 nm. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh sama dengan penelitian Neti *et al* (2018) dan sesuai dengan rentang panjang gelombang maksimum asam galat pada umumnya yaitu berkisar di 750—765 nm

(Gulcin, 2012). Panjang gelombang maksimum inilah yang digunakan untuk pengukuran absorbansi standar asam galat dan sampel.

Persamaan regresi, nilai R^2 dan nilai R seperti terlihat pada **Gambar 4.12**, **Gambar 4.13**, dan **Gambar 4.14**. Nilai R yang diperoleh dari replikasi 1,2 dan 3 secara berturut-turut sebesar 0,9959; 0,9996; dan 0,9983. Nilai R yang diperoleh mendekati 1 dan menunjukkan terdapat hubungan yang linear antara konsentrasi asam galat dan absorbansi, yang artinya semakin tinggi konsentrasi asam galat, maka semakin tinggi pula absorbansi yang diperoleh.

6. Penetapan Kadar Flavonoid

Standar yang digunakan untuk penetapan kadar flavonoid total pada penelitian ini adalah kuersetin. Kuersetin dipilih sebagai standar karena merupakan flavonoid golongan flavonol dengan gugus C-4 dan memiliki gugus hidroksi pada atom C-3 atau C-5 yang dapat membentuk kompleks berwarna kuning jika bereaksi dengan AlCl_3 10%. Panjang gelombang maksimum kuersetin yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 434 nm seperti yang terlihat pada **Lampiran 21**. Panjang gelombang maksimum yang diperoleh sama dengan hasil penelitian Hikmawanti dan Fatmawati, (2019). Pengukuran panjang gelombang maksimum ini bertujuan untuk mengetahui sehingga diperoleh nilai y (persamaan regresi linear), nilai R^2 (koefisien

panjang gelombang terjadinya absorbansi maksimum dari kompleks antara kuersetin dan AlCl_3 . *Operating time* (OT) kuersetin yang diperoleh pada penelitian ini yaitu 25 menit (**Lampiran 22**). OT yang diperoleh sama dengan penelitian Indriani *et al* (2015); Salamah & Wydiasari (2015). OT yang diperoleh digunakan sebagai acuan waktu inkubasi standar kuersetin dan sampel, yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum yang diperoleh sebelumnya. Konsentrasi kuersetin dan absorbansi ini kemudian diplot pada kurva baku,

Tabel Hasil penetapan kadar flavonoid total fraksi etil asetat ekstrak etanol daun merah kastuba

| Sampel | Berat sampel (g) | Absorbansi | Kadar flavonoid total (mg EK/g fraksi) | $\bar{x} \pm \text{SD}$ (mg EK/g fraksi) | CV (%) |
|--------|------------------|------------|--|--|--------|
| R1 | 0,0100 | 0,3436 | 145,6 | | |
| R2 | 0,0100 | 0,3651 | 146,8 | 141,9 \pm 6,1 | 4,29 |
| R3 | 0,0100 | 0,3768 | 133,4 | | |

DAFTAR PUSTAKA.

- Pacier, C., dan Martirosyan, D.M. (2015). Vitamin C: optimal dosages, supplementation and use in disease prevention. *Functional Foods in Health and Disease*, 5(3), 89-107.
- Pandey, A., Tripathi, S., & Pandey, C. A. (2014). Concept of standardization, extraction and pre phytochemical screening strategies for herbal drug. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry JPP*, 2(5), 115–119.
- Parwata, I.M.O.A. (2016). *Antioksidan*. Bukit Jimbaran: Universitas Udayana Press.
- Permatasari, L. (2015). Aktivitas Penangkapan Radikal Dpph (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) Ekstrak Metanol Kulit Buah Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*) dan Fraksi-Fraksinya. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Gadjah Mada: Yogyakarta.

- Raaman, N. (2006). *Phytochemical Technique*. New Delhi: New Delhi Publishing Agency.
- Robinson, T. (1995). *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Padmawinata, K. Bandung: Penerbit ITB.
- Rondonuwu, S. D. J., Suryanto, E., & Sudewi, S. (2017). Kandungan Total Fenolik dan Aktivitas Antioksidan dari Fraksi Pelarut Sagu Baruk (*Arenga microcharpa*). *Chemistry Progress*, 10(1), 2–5.
- Rusdi. (1990). *Tetumbuhan Sebagai Sumber Bahan Obat*. Padang: Pusat Penelitian Universitas Andalas.
- Sabathani, A., Widjanarko, S. B., & Yuwono, S. S. (2018). Optimasi Durasi Dan Rasio Bahan Per Pelarut Ekstrak Daun Pepaya Untuk Uji Aktivitas Antibakteri. *Jurnal Teknologi Pertanian*, 19(3), 193–206. <https://doi.org/10.21776/ub.jtp.2018.019.03.6>
- Salamah, N., dan Widayarsi, E. (2015). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanol Daun Kelengkeng (*Euphoria Longan* (L) Steud.) Dengan Metode Penangkapan Radikal 2,2'-Difenil-1-Pikrilhidrazil. *Pharmaciana*, 5(1), 25–34.
- Salim, R., Fauza, D., Selonni, F., & Taslim, T. (2021). Kadar Fenolat, Flavonoid Si Ungu Mentawai (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff). *Katalisator*, 6(1), 34–54.
- Samin, A.A., Bialangi, N., dan Salimi, Y.K. (2014). Penentuan Kadar Fenolik Total dan Aktivitas Antioksidan dari rambut jagung (*Zea mays* L.) Yang Tumbuh di Daerah Gorontalo. *Jurnal Sainteks*, 7(3), 213–226.
- Sangi, M., Runtuwene, M. R., Simbala, H. E., & Makang, V. M. A. (2008). Analisis Fitokimia Tumbuhan Obat di Kabupaten Minahasa Utara. *Chemistry Progress*, 1(1), 47–53.
- Sangi, M. S., Momuat, L. ., & Kumaunang, M. (2012). Toxicity Test and Phytochemical Screening On Palm Sugar (*Arenga pinnata*). *Jurnal Ilmiah Sains*, 12(2), 127–134.
- Sari, N. (2017). *Penentuan Kadar Total Fenol dan Total Flavonoid dari Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum acanthopodium DC.)*. Sumatra Utara: Repositori Institusi USU. Retrieved from <http://repositori.usu.ac.id/bitstream/handle/123456789/12813/121501075.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sastrohamidjojo, H. (2005). *Kromatografi, Edisi Kedua*. Yogyakarta: Liberty.
- Senja, R.Y., Issusilaningtyas, E., Nugroho, A.K., Setyowati, E.P. (2014). The Comparison Of Extraction Method And Solvent Variation On Yield And Antioxidant Activity Of *Brassica*

- Oleracea L. Var. Capitata F. Rubra* Extract. *Traditional Medicine Journal*, 19(1), 43-48.
- Sharif, H. B., Mukhtar, M. D., Mustapha, Y., & Lawal, A. O. (2015). Preliminary Investigation of Bioactive Compounds and Bioautographic Studies of Whole Plant Extract of *Euphorbia pulcherrima* on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Advances in Pharmaceutics*, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2015/485469>
- Shraim, A. M., Ahmed, T. A., Rahman, M., & Hijji, Y. M. (2021). Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *LWT- Food Science and Technology*, 150(1), 111932. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111932>
- Simanjuntak, P. (2003). Strategi Pencarian Senyawa Bioaktif Baru Dari Sumber Bahan Alami Tumbuhan. In *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* (Issue Vol 1 No 2 (2003): JIFI, pp. 73–77). <http://jifi.farmasi.univpancasila.ac.id/index.php/jifi/article/view/658>
- Singleton, V.L. dan Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of Total Phenolic with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagent. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Sopiah, B., Muliastuti, H., & Yuanita, E. (2019). Skrining Fitokimia dan Potensi Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Hijau dan Daun Merah Kastuba. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 17(1), 27. <https://doi.org/10.35814/jifi.v17i1.698>
- Srividya, A.R. (2014). Evaluation of antioxidant, antimicrobial, and cytotoxicity activity of hydroethanolic extract and its fractions of *Acorous calamus* Lin. *International Journal of Pharmaceutical Research Scholar*, 3(1), 114-125. https://www.researchgate.net/publication/260148667_Evaluation_of_antioxidant_antimicrobial_and_cytotoxicity_activity_of_hydroethanolic_extract_and_its_fractions_of_Acorous_calamus_Linn