

Pengaruh Perbedaan Jenis Pelarut Terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)

The Effect of Different Types of Solvents on Total Levels of Flavonoid Extract (*Annona muricata* L.)

Ni Ketut Linda Puspa Yani ^{1*}

Kunti Nastiti ²

Noval ³

Pharmacy Department, Health Faculty,
Sari Mulia University, Banjarmasin City,
South Borneo 70238, Indonesia

*email:

niketutlyndapuspa811@gmail.com

Abstrak

Salah satu tanaman yang berkhasiat untuk mencegah suatu penyakit yaitu daun sirsak (*Annona muricata* L.). Tanaman ini mengandung senyawa saponin, terpenoid, steroid, flavonoid, tannin dan alkaloid. Senyawa yang paling berperan dalam menimbulkan efek farmakologi adalah senyawa flavonoid sebagai sumber antioksidan. Tingkat kepolaran pelarut dalam penyarian akan mempengaruhi kandungan senyawa yang diekstrak berdasarkan prinsip like dissolve like. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui berapa kadar flavonoid total pada tingkatan jenis pelarut yang berbeda dan pengaruh perbedaan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan terhadap kadar flavonoid total. Selain itu dilakukan pengujian secara kualitatif untuk mengetahui senyawa flavonoid. Jenis penelitian yang digunakan yaitu secara Pre-eksperimental, ekstraksi dengan metode maserasi terkendali suhu, cahaya, lama waktu dan pengadukan. Analisis kualitatif dengan uji pereksi warna dan Kromatografi Lapis Tipis. Penetapan kadar menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Hasil penelitian pada identifikasi dengan uji warna dan Kromatografi Lapis Tipis pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan positif mengandung flavonoid dan hasil penetapan kadar flavonoid pada masing-masing pelarut adalah 68,9048 mgQE/g, 97,2381 mgQE/g dan 73,6667 mgQE/g. Analisis statistik ANOVA pada setiap kelompok mempunyai perbedaan yang signifikan dengan nilai $p < 0,001$ ($< 0,05$). Senyawa flavonoid dipengaruhi oleh tingkat kepolaran pelarut, terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dengan jenis pelarut yang berbeda terhadap kadar flavonoid total. Kadar flavonoid terbesar terdapat pada etil asetat diikuti n-heksan dan etanol 96%.

Kata Kunci:

Annona muricata
Flavonoid total
Jenis pelarut

Keywords:

Annona muricata
Total flavonoid
Type of solvent

Abstract

One of the plants that is efficacious to prevent a disease is the leaf *Annona muricata* L. This plant contains contains saponins, terpenoids, steroids, flavonoids, tannins and alkaloids. Compounds that have the most role in causing pharmacological effects are flavonoid compounds as a source of antioxidants. The level of polarity of the solvent in the study will affect the content of the compound extracted based on the principle of like dissolves like. This study was conducted to determine the total flavonoid content at different levels of solvent types and the effect of different solvents of 96% ethanol, ethyl acetate and n-hexane on total flavonoid content. In addition, qualitative tests were carried out to determine the flavonoid compounds. The type of research used is pre-experimental, extraction with controlled maceration method of temperature, light, length of time and stirring. Qualitative analysis with color correction test and Thin Layer Chromatography. Assay using UV-Vis spectrophotometry. The results of the research on identification by color test and Thin Layer Chromatography on the extract *Annona muricata* L. using 96% ethanol, ethyl acetate and n-hexane as solvents were positive for flavonoids and the results of the determination of flavonoid levels in each solvent were 68,9048 mgQE/g, 97,2381 mgQE/g and 73,6667 mgQE/g. ANOVA statistical analysis in each group had a significant difference with $p = < 0.001$ (< 0.05). Flavonoid compounds are influenced by the level of solvent polarity, there are significant differences between treatment groups with different types of solvents on total flavonoid levels. The highest flavonoid content was found in ethyl acetate followed by n-hexane and 96% ethanol.



PENDAHULUAN

Indonesia adalah Negara kedua setelah Brazil yang memiliki keanekaragaman flora fauna yang sangat tinggi. Persebaran spesies tumbuhan dan hewan di Indonesia sangat unik (Hasanuddin & Mulyadi, 2014). Keanekaragaman hayati yang ada di Indonesia ini tidak hanya digunakan sebagai bahan pangan ataupun untuk dinikmati keindahannya saja, tetapi dapat juga digunakan untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Masyarakat di Indonesia banyak menggunakan tanaman berkhasiat untuk mengobati berbagai penyakit secara tradisional seperti jamu dan berbagai olahan tradisional lainnya. Salah satu tanaman yang berkhasiat untuk mencegah suatu penyakit yaitu daun sirsak (*Annona muricata L.*).

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan salah satu tanaman yang bisa dimanfaatkan sebagai obat dimana secara empiris atau secara tradisional masyarakat di Kabupaten Tanah Bumbu menggunakan daun sirsak untuk mengobati kolesterol dan asam urat. Penggunaannya dengan cara merebus lima lembar daun sirsak kemudian air rebusannya diminum secara rutin satu kali dalam sehari. Sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan salah satu jenis tanaman dari familia Annonaceae dan banyak tumbuh di Pulau Kalimantan. Tanaman ini merupakan tanaman bahan obat nasional yang memiliki multi khasiat (Mukhriani et al., 2015). Selain itu, masyarakat juga punya keyakinan bahwa penggunaan daun sirsak secara rutin dapat mencegah dan mengobati penyakit kanker, mengobati demam, sakit pinggang, hipertensi, kejang-kejang dan tumor. Hal ini dapat didukung pula dengan penelitian bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) memberikan efek menurunkan kadar asam urat (Aditya et al., 2020) dan menurunkan kadar kolesterol total plasma (Rochim et al., 2021).

Berdasarkan penelitian (Rahman et al., 2017) ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) mengandung senyawa saponin, terpenoid, steroid, flavonoid, tannin dan alkaloid. Senyawa yang paling berperan dalam menimbulkan efek farmakologi adalah senyawa

flavonoid. Flavonoid hampir terdapat pada semua bagian tumbuhan yaitu pada bagian akar, batang, kulit batang, daun, bunga bahkan dapat ditemukan pada buahnya. Flavonoid termasuk senyawa fenolik yang kaya akan gugus hidroksil dan diketahui memiliki aktivitas yang besar sebagai antioksidan yaitu dengan cara menangkal radikal bebas yang berperan pada timbulnya penyakit degeneratif melalui mekanisme perusakan sistem imunitas tubuh, oksidasi lipid dan protein (Rao et al., 2020), sebagai antimikroba dan antiinflamasi (Errayes et al., 2020).

Proses pengambilan senyawa aktif tumbuhan dapat disebut sebagai proses ekstraksi. Ekstraksi merupakan tahap yang dilakukan untuk memisahkan suatu zat menggunakan pelarut tertentu. Pelarut mempunyai tiga tingkatan sifat kelarutan yaitu non polar, semi polar dan polar. Tingkat kepolaran pelarut dalam penelitian akan mempengaruhi kandungan senyawa yang di ekstrak berdasarkan prinsip *like dissolve like* yaitu senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar (Arifianti et al., 2014). Pada penelitian (Rivai et al., 2020) penetapan kadar flavonoid daun sirsak dengan perbedaan pelarut yaitu etanol 70% dan air, hasil penelitian menunjukkan terdapat perbedaan kadar flavonoid. Begitu pula pada penelitian (Mukhriani et al., 2015) penetapan kadar flavonoid daun sirsak dengan perbedaan pelarut etanol 70% dan n-heksan, hasil menunjukkan terdapat perbedaan kadar flavonoid dimana kadar flavonoid yang lebih besar yaitu pada n-heksan, namun pada penelitian (Vifta & Advistasari, 2018) penetapan kadar flavonoid pada tanaman parijoto (*Medinilla speciosa B.*) dengan perbedaan pelarut yaitu etanol 96%, n-heksan dan etil asetat, ternyata pada etanol 96% menunjukkan kadar flavonoid paling besar, dan pada penelitian lainnya penetapan kadar flavonoid daun saliera (*Lantana camara L.*) menggunakan pelarut etanol 70%, etil asetat dan n-heksan, hasilnya pelarut etil asetat yang menunjukkan kadar flavonoid tertinggi (Rahmati et al., 2020). Hal itu menunjukkan bahwa

terdapat pengaruh pelarut terhadap hasil Flavonoid totalnya. Sehingga peneliti ingin mengetahui perbedaan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan terhadap kadar flavonoid pada daun sirsak (*Annona muricata L.*). Berdasarkan hal tersebut peneliti ingin melihat perbedaan kadar flavonoid daun sirsak (*Annona muricata L.*) dari proses ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya.

METODOLOGI

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian yaitu batang pengaduk, bejana maserasi, toples, cawan porselin, ayakan (*Siever Shake SS-200*), corong (*Pyrex*), kertas saring, gelas erlenmeyer (*Pyrex*), gelas kimia (*Pyrex*), labu ukur (*Pyrex*), pipet volume (*Pyrex*), rotary evaporator (*DLAB RE100-Pro*), spektrofotometer UV-Vis (*Pharo 300*) dan timbangan analitik (*Shimadzu Corporation ATX 224*).

Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu daun sirsak (*Annona muricata L.*), etanol 96% (*teknis*), etil asetat (*pro analisis, Merck*), n-heksan (*Merck*), aluminium klorida (AlCl_3) 10%, asam asetat 5% (*Merck*), kuersetin (*Sigma-aldrich*), FeCl_3 , HCl pekat, serbuk Mg, n-butanol, aquadest dan etanol 70% (*Merck*).

Metode Penelitian

Pengolahan Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

Pengolahan daun sirsak mulai dari pengumpulan bahan, sortasi basah, Pencucian untuk menghilangkan kotoran atau benda asing yang masih menempel pada tanaman setelah sortasi basah, perajangan yang dilakukan secara manual yaitu menggunakan alat pemotong gunting, Pengeringan dilakukan dibawah sinar matahari ditutup dengan kain hitam agar tidak terkena sinar matahari langsung, Sortasi kering untuk memisahkan kotoran atau benda asing yang masih menempel sehingga

diperoleh simplisia kering daun sirsak yang baik (R. Wahyuni et al., 2014).

Pembuatan Ekstrak

Sebanyak 250 gram serbuk daun sirsak dimasukan kedalam bejana kemudian masing-masing bejana yang berisi serbuk daun sirsak di tambahkan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan sebanyak 2,5 liter. Dibiarkan selama 24 jam terlindung dari cahaya, diaduk 2 kali sehari, pengadukan harus konstan waktu dan jumlah pengaduk pada masing-masing bejana 10 kali. Kemudian larutan pada masing-masing tingkatan pelarut disaring, dipisahkan filtrat dengan ampas menggunakan kertas saring, kemudian hasil ampas di remaserasi dengan perlakuan yang sama menggunakan pelarut yang baru dilakukan sebanyak 3 kali. Filtrat yang dihasilkan pada masing-masing pelarut dipekatkan dengan alat rotary evaporator.

Anallisis Kualitatif

Uji senyawa flavonoid dengan reaksi warna

1. Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan Mg

Sebanyak 10 mg ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl pekat, kemudian ditambahkan sedikit serbuk Mg. Reaksi positif mengandung flavonoid ditandai dengan perubahan warna menjadi merah-oranye (Asmorowati & Lindawati, 2019)

2. Identifikasi senyawa flavonoid dengan HCl

Sebanyak 10 mg ekstrak ditambahkan beberapa tetes HCl pekat kemudian dipanaskan. Reaksi positif mengandung flavonoid jika memberikan hasil warna putih (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Uji senyawa fenolik dengan reaksi warna FeCl_3

Sebanyak 10 tetes ekstrak, ditambah 3-4 tetes FeCl_3 . Reaksi positif mengandung fenolik ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau hingga biru kehitaman (Rivai et al., 2019).

Uji senyawa flavonoid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Fase diam yang digunakan pada identifikasi flavonoid dengan KLT yaitu silica gel GF₂₅₄, sebelum digunakan lempeng diaktifkan terlebih dahulu dengan cara di oven

selama 30 menit pada suhu 100°C. Fase gerak yang digunakan yaitu campuran n-butanol: asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5) untuk mengelusi plat yang ditotolkan dengan pembanding kuersetin dan ekstrak etanol 96% dan campuran n-heksan:etil asetat dengan perbandingan (3:5) untuk mengelusi plat yang ditotolkan dengan ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan. Larutan ekstrak ditotolkan pada plat KLT lalu di letakkan dalam bejana yang telah jenuh dibiarkan hingga eluen sampai pada tanda batas yang telah ditentukan. Plat KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan lalu diamati bercak dibawah lampu ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm (Ferdinand & Rizki, 2021). Selanjutnya dilakukan penyemprotan dengan AlCl₃ 5% jika bercak yang dihasilkan menjadi warna kuning intensif menunjukkan positif mengandung flavonoid (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Analisis Kuantitatif

1. Pembuatan larutan baku induk kuersetin 1000 ppm.
Ditimbang sebanyak 100 mg baku standar kuersetin kemudian dilarutkan dengan etanol 70% sampai dengan 100 ml (Asmorowati & Lindawati, 2019).
2. Pembuatan larutan baku standar kuersetin 100 ppm.
Larutan baku induk dipipet sebanyak 1 ml kemudian dicukupkan volumenya sampai 10 ml dengan etanol 70% sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm (Asmorowati & Lindawati, 2019).
3. Pembuatan larutan blangko.
Pipet 1 ml AlCl₃ 10 % dan 8 ml asam asetat 5% tambahkan etanol 70% sampai volumenya 10 ml (Asmorowati & Lindawati, 2019).
4. Penentuan panjang gelombang maksimum (λ maks) kuersetin.
Larutan baku kerja kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan AlCl₃ 10% dan 8 ml asam asetat 5%. Lakukan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 400-800 nm (Rahmati et al., 2020). Hasil panjang gelombang maksimum tersebut digunakan untuk mengukur serapan dari sampel ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) (Asmorowati & Lindawati, 2019).
5. Pembuatan *operating time*
Larutan baku standar kuersetin 100 ppm diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 1 ml AlCl₃ 10 % dan 8 ml asam asetat 5%, kemudian larutan tersebut diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang dihasilkan dari penetapan panjang gelombang maksimum dengan interval waktu 2 menit hingga diperoleh absorbansi yang stabil. Diamati kurva hubungan antara absorbansi, waktu, dan tentukan *operating time* (Asmorowati & Lindawati, 2019).
6. Pembuatan kurva baku kuersetin.
Larutan baku induk kuersetin 1000 ppm dipipet sebanyak 0,2 ml; 0,3 ml; 0,4 ml; 0,5 ml; 0,6 ml kemudian masing-masing ditambahkan etanol 70% sampai volumenya 5 ml sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm. Masing-masing konsentrasi dari seri baku kuersetin dipipet 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml AlCl₃ 10% dan 8 ml asam asetat 5%, didiamkan selama *operating time*, absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Asmorowati & Lindawati, 2019).
7. Penentuan kadar flavonoid total ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*).
Ditimbang 100 mg masing-masing ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilarutkan dengan etanol 70% sampai volumenya 100 ml, larutan tersebut dipipet masing-masing 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml larutan AlCl₃ 10% dan 8 ml asam asetat 5%, sampel didiamkan selama *operating time*. Absorbansi ditentukan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan replikasi 3 kali setiap pelarut pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh (Asmorowati & Lindawati, 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

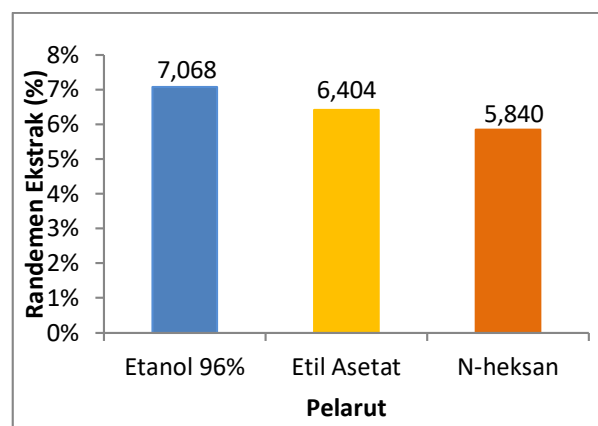
Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu tanaman sirsak (*Annona muricata L.*) pada bagian daun yang tua yang dilihat dari warna daun yaitu berwarna hijau tua dengan ukuran daun yang lebih besar yaitu pada panjang helaian daun sekitar 10-18 cm dan lebar sekitar 4-7 cm. Berdasarkan hasil pengolahan diperoleh simplisia kering daun sirsak dengan bobot 800 g. Simplisia kering daun sirsak kemudian dilakukan penyerbukan dengan menggunakan blender, serbuk yang telah di blender diayak dengan ukuran partikel 40/80 mesh agar menghasilkan serbuk yang halus dan seragam.

Pembuatan Ekstrak

Daun sirsak dibuat simplisia yang dilakukan dengan tahapan yang sesuai sehingga diperoleh simplisia kering. Sebelum dilakukan ekstraksi, simplisia kering diserbukan terlebih dahulu menggunakan blender kemudian diayak menggunakan pengayakan dengan ukuran partikel 40/80 mesh untuk menghasilkan serbuk yang halus dan seragam. Ekstraksi serbuk simplisia daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi yang berlangsung selama 3x24 jam, Sebanyak 250 gram serbuk simplisia masing-masing ditambahkan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan sebanyak 2,5 liter dibiarkan selama proses maserasi, terlindung dari cahaya, diaduk 2 kali sehari dengan waktu yang konstan dan jumlah yang sama pada masing-masing bejana yaitu sebanyak 10 kali hingga diperoleh filtrat. Filtrat yang dihasilkan pada masing-masing pelarut dipisahkan dengan alat rotary evaporator suhu yang digunakan 50°C agar senyawa yang terkandung pada ekstrak tidak rusak dan tidak mengalami penguraian, sehingga diperoleh ekstrak kental yang baik.

Tabel I. Hasil Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

| Simplisia | Pelarut | Ekstrak kental | Randemen Ekstrak |
|-----------|-------------|----------------|------------------|
| 250 gram | Etanol 96% | 17,67 gram | 7,068 % |
| 250 gram | Etil Asetat | 16,01 gram | 6,404 % |
| 250 gram | N-heksan | 14,60gram | 5,840 % |



Gambar I. Grafik Hubungan Pelarut dengan Randemen Ekstrak

Ekstrak kental yang diperoleh pada pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan masing-masing adalah 17,67; 16,01; 14,60 gram sehingga diperoleh perhitungan randemen ekstrak sebesar 7,068; 6,404; 5,840%. Hasil yang diperoleh ekstrak kental yang paling banyak didapatkan yaitu pada etanol 96%.

Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan reaksi warna

Identifikasi senyawa flavonoid pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) dilakukan uji dengan menggunakan pereaksi warna Mg dan HCl kemudian dilakukan identifikasi senyawa fenolik menggunakan pereaksi FeCl₃ hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel II dan Tabel III.

Tabel II. Hasil Identifikasi Senyawa Flavonoid

| No | Pereaksi | Hasil | | | Keterangan |
|----|-----------------------------|--------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------|
| | | Ekstrak etanol 96% | Ekstrak etil asetat | Ekstrak n-heksan | |
| 1 | Ekstrak + HCl Pekat + Mg | (+) | (+) | (+) | (+) terbentuk warna merah orange |
| 2 | Ekstrak + HCl Pekat | (+) | (+) | (+) | (+) terbentuk warna putih kekuningan |

(+) = positif mengandung senyawa
(-) = tidak mengandung senyawa

Tabel III. Hasil Identifikasi Senyawa Fenolik

| No | Pereaksi | Hasil | | | Keterangan |
|----|-----------------------------|--------------------|---------------------|------------------|---|
| | | Ekstrak etanol 96% | Ekstrak etil asetat | Ekstrak n-heksan | |
| I | Ekstrak + FeCl ₃ | (+) | (+) | (+) | (+) terbentuk warna hijau-biru kehitaman |

(+) = positif mengandung snyawa
(-) = tidak mengandung senyawa

Identifikasi yang pertama menggunakan pereaksi *Wilstater* yaitu penambahan HCl pekat dan serbuk Mg pada larutan ekstrak daun sirsak. Hasil yang diperoleh menunjukkan reaksi positif dengan terbentuknya warna merah-orange. Penambahan larutan HCl berfungsi untuk mendeteksi senyawa yang mengandung inti benzopiranon, sehingga akan menghasilkan garam benzopirilium yang disebut juga garam flavilium. Penambahan Mg dan HCl terjadi reaksi reduksi menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna orange pada flavonol (Asmorowati & Lindawati, 2019).

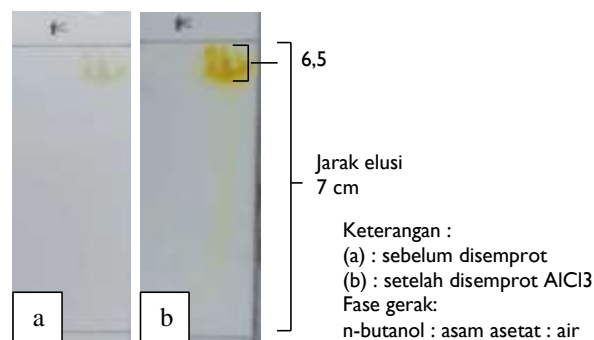
Pada reaksi warna kedua menggunakan pereaksi Smith-Metcalfe yaitu dengan penambahan HCl pekat pada larutan ekstrak daun sirsak kemudian dipanaskan. Hasil yang diperoleh menunjukkan reaksi positif dengan terbentuknya warna putih kekuningan setelah pemanasan yang serupa dengan pembanding kuersetin. Penambahan larutan HCl pekat berfungsi untuk menghidrolisis dan memutus ikatan glikosida. Dilakukan pemanasan berfungsi untuk mempercepat reaksi hidrolisis yang terjadi, sehingga terjadi perubahan warna menjadi putih (Asmorowati & Lindawati, 2019).

Pada reaksi warna ketiga menggunakan pereaksi ferri klorida untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa fenolik, dilakukannya identifikasi karena senyawa fenolik banyak terdapat pada berbagai tumbuhan yang memiliki aktivitas sebagai antioksidan. FeCl₃ ditambahkan pada larutan ekstrak daun sirsak, reaksi positif yang dihasilkan ditandai dengan terbentuknya warna hijau-biru kehitaman. Penambahan larutan FeCl₃ bertujuan untuk membentuk reaksi kompleks antara logam Fe dari FeCl₃

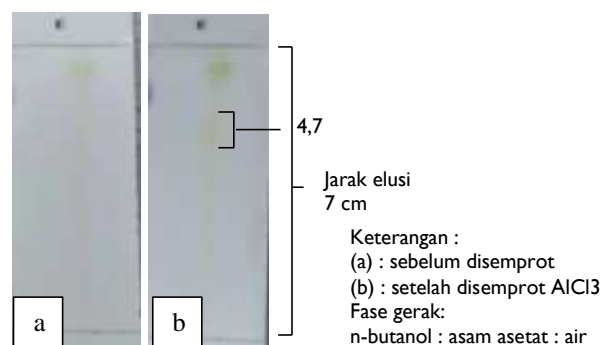
dengan gugus hidroksil yang ada pada fenol (Putri et al., 2019). Hasil yang diperoleh yaitu terbentuk reaksi positif yang ditandai dengan perubahan warna larutan dari hijau terang menjadi hijau hingga biru kehitaman (Rivai et al., 2019).

Identifikasi Senyawa Flavonoid dengan KLT

Reaksi positif flavonoid dilakukan iji lebih lanjut dengan Identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) untuk memastikan adanya senyawa flavonoid pada sampel sebelum dilakukan penetapan kadar flavonoid. Fase gerak yang digunakan adalah campuran n-butanol : asam asetat : air dengan perbandingan (4:1:5) untuk mengelusi plat yang ditotolkan dengan pembanding kuersetin dan ekstrak etanol 96% dan campuran n-heksan : etil asetat dengan perbandingan (3:5) untuk mengelusi plat yang ditotolkan dengan ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksan.

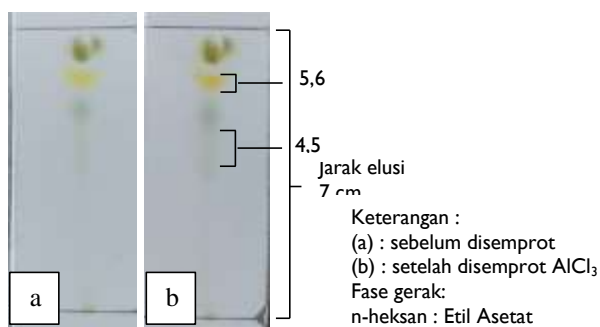


Gambar II. Hasil KLT Pada Pembanding Kuersetin



Gambar III. Hasil KLT Pada Etanol 96%

Hasil KLT ekstrak etanol 96% pada sinar tampak setelah disemprot AlCl₃ terbentuk warna kuning intensif yang serupa dengan pembanding kuersetin menunjukkan positif flavonoid.



Gambar IV. Hasil KLT Pada Etil Asetat

Hasil KLT ekstrak Etil Asetat pada sinar tampak setelah disemprot AlCl₃ terbentuk warna kuning intensif yang serupa dengan pembanding kuersetin menunjukkan positif flavonoid.



Gambar V. Hasil KLT Pada N-heksan

Hasil KLT ekstrak n-heksan pada sinar tampak setelah disemprot AlCl₃ terbentuk warna kuning intensif yang serupa dengan pembanding kuersetin menunjukkan positif flavonoid.

Hasil positif yang diperoleh kemudian dihitung nilai Rf-nya dengan menggunakan rumus:

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Penggunaan fase gerak yang berbeda bertujuan untuk dapat memberikan pemisahan sesuai dengan sifat kepolaran pelarut yang digunakan. Eluen yang baik adalah eluen yang dapat memisahkan senyawa dalam jumlah yang banyak yang ditandai dengan munculnya noda (Ferdinand & Rizki, 2021). Hasil KLT menunjukkan munculnya bercak yang dapat dilihat pada penyinaran dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Setelah disemprot reagen AlCl₃ bercak yang dihasilkan menunjukkan warna kuning intensif

serupa dengan standar kuersetin yang menunjukkan positif mengandung flavonoid (Asmorowati & Lindawati, 2019). Bercak noda flavonoid dihitung nilai Rf pada masing-masing pelarut, didapatkan nilai Rf 0,7 pada etanol 96%, Rf 0,8 dan Rf 0,6 pada etil asetat dan 0,9 pada n-heksan.

Analisis Kuantitatif

Sampel yang telah dilakukan identifikasi flavonoid dan telah diyakini keberadaan flavonoid selanjutnya dilakukan identifikasi kuantitatif untuk melihat kadar flavonoid pada masing-masing sampel dengan menggunakan spektrofotometri UV-Vis, metode ini merupakan metode yang sederhana untuk mendapatkan kuantitas zat yang sangat kecil dimana angka yang terbaca langsung dicatat oleh detector dan tercetak dalam bentuk angka digital ataupun grafik. Penggunaan metode spektrofotometri UV-Vis pada analisis flavonoid yaitu karena flavonoid memiliki sistem aromatic yang terkonjugasi sehingga dapat menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum sinar ultraviolet dan spektrum sinar tampak (Aminah et al., 2017).

Pertama dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum kuersetin yaitu bertujuan untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimum. Penggunaan kuarsetin dipilih sebagai larutan standar karena kuarsetin merupakan flavonoid golongan flavonol yang memiliki gugus keto pada (C-4) dan mempunyai gugus hidroksil pada atom (C-3) atau (C-5) yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Aminah et al., 2017). Penambahan AlCl₃ dalam sampel dapat membentuk kompleks antara aluminium klorida dengan kuersetin sehingga akan terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah visibel (tampak) dan menghasilkan larutan berwarna lebih kuning, fungsi penambahan asam asetat yaitu untuk mempertahankan panjang gelombang pada daerah visibel (Asmorowati & Lindawati, 2019). Penetapan panjang gelombang maksimum kuersetin dilakukan dengan cara membaca serapan larutan baku standar kuersetin 100 ppm pada rentang panjang

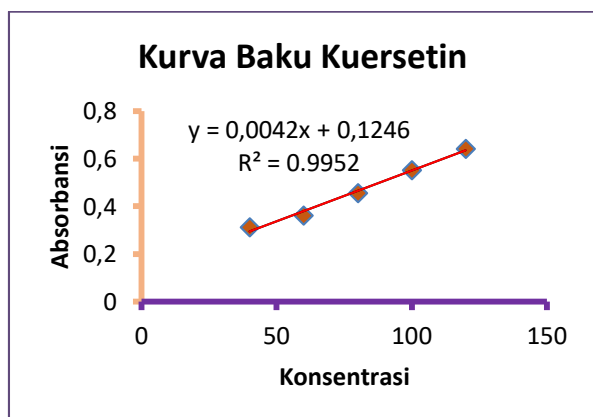
gelombang 400-800 nm. Hasil panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 414 nm. Langkah selanjutnya yaitu penentuan *operating time* yang bertujuan untuk mengetahui lama waktu yang diperlukan larutan untuk mencapai absorbansi konstan atau waktu ketika sampel bereaksi sempurna dan membentuk senyawa kompleks. Pengukuran dilakukan pada interval waktu 2 menit selama 60 menit. Hasil yang diperoleh pada penentuan *operating time* yaitu konstan pada menit ke 34.

Selanjutnya membuat kurva baku kuersetin dengan masing-masing konsentrasi yaitu 40 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm dan 120 ppm yang kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum yang dihasilkan yaitu 414 nm.

Tabel IV. Absorbansi Kurva Baku Kuersetin

| Konsentrasi (ppm) | Absorbansi | | | Rata-rata |
|-------------------|------------|-------|-------|-----------|
| | R1 | R2 | R3 | |
| 40 | 0,310 | 0,311 | 0,311 | 0,311 |
| 60 | 0,361 | 0,362 | 0,362 | 0,362 |
| 80 | 0,455 | 0,456 | 0,456 | 0,456 |
| 100 | 0,550 | 0,551 | 0,551 | 0,551 |
| 120 | 0,640 | 0,641 | 0,641 | 0,641 |

Hasil yang diperoleh menunjukkan konsentrasi berbanding lurus dengan nilai absorbansi yaitu semakin besar konsentrasi kurva baku kuersetin maka semakin tinggi juga nilai absorbansi yang dihasilkan. Sehingga diperoleh persamaan regresi linier $y=0,0042x+0,1246$ dan nilai koefisien korelasi (r) yaitu 0,9905.



Gambar VI. Kurva Baku Kuersetin

Nilai koefisien korelasi (r) yang diperoleh yaitu mendekati angka 1 yang menunjukkan bahwa persamaan regresi tersebut adalah linier, dapat dikatakan bahwa konsentrasi dan absorbansi memiliki korelasi yang sangat kuat (Asmorowati & Lindawati, 2019).

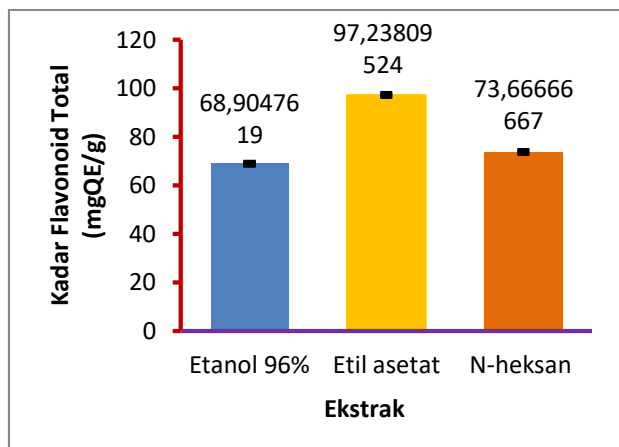
Tabel V. Absorbansi Sampel

| Ekstrak | Absorbansi | | | Rata-rata |
|-------------|------------|-------|-------|-----------|
| | R1 | R2 | R3 | |
| Etanol 96% | 0,413 | 0,414 | 0,415 | 0,414 |
| Etil asetat | 0,532 | 0,533 | 0,534 | 0,533 |
| N-heksan | 0,433 | 0,434 | 0,435 | 0,434 |

Penentuan kadar flavonoid ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) dengan perbedaan jenis pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan n-heksan masing-masing sampel yang akan diuji ditunggu selama *operating time* setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang maksimum yang diperoleh yaitu 414 nm, absorbansi dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali sehingga diperoleh absorbansi rata-rata pada etanol 96% yaitu 0,414; etil asetat yaitu 0,533; n-heksan yaitu 0,434. Absorbansi yang diperoleh dilakukan perhitungan dengan memasukan ke dalam persamaan regresi linier yang kemudian digunakan untuk menghitung kadar flavonoid total.

Tabel VI. Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*)

| Ekstrak | Konsentrasi ekuivalen (mg/ml) | Kadar Flavonoid Total (mgQE/g) | Kadar Flavonoid Total (rata-rata)(mgQE/g) | SD |
|-------------|-------------------------------|--------------------------------|---|---------|
| Etanol 96% | 0,0686667 | 68,6667 | 68,9048 | ±0,2381 |
| | 0,0689048 | 68,9048 | | |
| | 0,0691429 | 69,1429 | | |
| Etil asetat | 0,097 | 97 | 97,2381 | ±0,2381 |
| | 0,0972381 | 97,2381 | | |
| | 0,0974762 | 97,4762 | | |
| N-heksan | 0,0734286 | 73,4286 | 73,6667 | ±0,2381 |
| | 0,0736667 | 73,6667 | | |
| | 0,0739048 | 73,9048 | | |



Gambar VII. Kurva Baku Kuersetin

Hasil kadar flavonoid total yang diperoleh yaitu pada ekstrak etanol 96% yaitu 68,9048 mgQE/g, etil asetat 97,2381 mgQE/g dan n-heksan 73,6667 mgQE/g. Hasil yang diperoleh pada penetapan kadar flavonoid menggunakan perbandingan jenis pelarut yang berbeda menunjukkan kadar flavonoid tertinggi yaitu etil asetat sebesar 97,2381 mgQE/g kemudian n-heksan sebesar 73,6667 mgQE/g dan kadar flavonoid paling rendah yaitu pada etanol 96% sebesar 68,9048 mgQE/g.

Pada pelarut etil asetat yang merupakan pelarut semi polar yang dapat menarik senyawa flavonoid yang bersifat polar maupun non polar. Pada tumbuhan terdapat beberapa flavonoid bebas seperti flavon, flavanon dan flavonol yang mudah larut dalam pelarut semi polar (Rahmati et al., 2020). Kadar flavonoid pada ekstrak n-heksan lebih kecil dari etanol, dimana n-heksan merupakan senyawa yang bersifat non polar hal ini menunjukkan bahwa jumlah senyawa yang bersifat non polar yang dapat larut dalam n-heksan lebih kecil dari senyawa yang dapat larut oleh pelarut semi polar. Terdapat beberapa jenis flavonoid yang dapat larut dalam pelarut non polar seperti aglikon polimetoksi atau isoflavon yang gugus gula atau bentuk glikosidanya sudah terlepas sehingga hanya dapat larut dalam pelarut non polar (Rahmati et al., 2020). Ekstrak etanol 96% menunjukkan kadar flavonoid yang paling kecil, etanol merupakan pelarut yang bersifat polar, hal ini menunjukkan pada penelitian jumlah senyawa yang

bersifat polar yang dapat larut dalam etanol 96% lebih kecil daripada jumlah senyawa yang dapat terlarut dalam etil asetat dan n-heksan.

Tabel VII. Hasil Uji Normalitas

| | | Tests of Normality | | | | | |
|-----------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
| | jenis pelarut | Statistic | Df | Sig. | Statistic | df | Sig. |
| kadar (%) | etanol 96% | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |
| | etil asetat | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |
| | n-heksan | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |

Analisis Data dilakukan pengujian statistika untuk mengetahui perbedaan pada tiap kelompok. Tahap pertama dilakukan uji normalitas untuk melihat data telah terdistribusi normal atau tidak, nilai $p > \alpha$ (0,05) maka data terdistribusi normal. Hasil menunjukkan nilai $p=1,000$ ($>0,05$) yang berarti data terdistribusi normal sehingga penelitian ini dilanjutkan ke pengujian ANOVA.

Tabel VIII. Hasil Uji One Way Anova

| ANOVA | | | | | |
|----------------|----------------|----|-------------|-----------|-------|
| kadar (%) | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
| Between Groups | 1381.066 | 2 | 690.533 | 12181.000 | <.001 |
| Within Groups | .340 | 6 | .057 | | |
| Total | 1381.406 | 8 | | | |

Nilai $p < 0,05$ maka ada perbedaan signifikan pada kelompok perlakuan tersebut. Pada penelitian ini hasil menunjukkan nilai signifikan $p=<0,001$ ($<0,05$) artinya antar kelompok perlakuan ini ada perbedaan signifikan yang membuktikan adanya pengaruh pelarut terhadap kadar flavonoid total.

KESIMPULAN

Penelitian ini dapat disimpulkan bawa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan pada analisisis kualitatif menggunakan uji reaksi warna dan KLT menunjukkan

positif mengandung flavonoid. Pada penetapan kadar flavonoid kadar terbesar terdapat pada etil asetat diikuti n-heksan dan etanol 96% yang masing-masing sebesar 97,2381 mgQE/g, 73,6667 mgQE/g dan 68,9048 mgQE/g. Secara Analisis statistik ANOVA terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan dengan jenis pelarut yang berbeda terhadap kadar flavonoid total.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada apt. Kunti Nastiti, S.Far., M.Sc. dan apt. Noval, M.Farm. yang telah memberikan arahan dan bimbingan dalam penyelesaian penelitian ini serta semua pihak yang membantu dalam penyelesaian pelaksanaan kegiatan ini.

REFERENSI

- Aditya, Nuari, D. A., & Hasyul, S. F. P. 2020. Review: Aktivitas Antihiperurisemia Dari *Famili Annonaceae*. *Jurnal Pharmascience*, 7(2), 12.
- Aminah, Tomayahu, N., & Abidin, Z. 2017. Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Kulit Buah Alpukat (*Persea americana Mill.*) Dengan Metode Spektrofotometri UV-VIS. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*, 4(2), 226–230.
- Arifianti, L., Oktarina, R. D., Kusumawati, I., Farmakognosi, D., Farmasi, F., & Airlangga, U. 2014. Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *Journal Planta Husada Vol.2, No.1 April 2014*. *E-Journal Planta Husada*, 2(1), 3–6.
- Asmorowati, H., & Lindawati, N. Y. 2019. Determination of total flavonoid content in avocado (*Persea americana Mill.*) using spectrofotometry method Penetapan kadar flavonoid total alpukat (*Persea americana Mill.*) dengan metode spektrofotometri. 15(2), 51–63.
- Errayes, A. O., Abdussalam-mohammed, W., & Darwish, M. omar. 2020. Review of *Phytochemical and Medical Applications of Annona Muricata Fruits*. *Journal of Chemical Reviews*, 2(1), 70–79.
- Ferdinand, A., & Rizki, F. S. 2021. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Pandan Hutan Jenis Baru *Freycinetia Sessiliflora* Rizki. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 4(1), 1–6.
- Hasanuddin, & Mulyadi. 2014. *Botani Tumbuhan Rendah*. Botani Tumbuhan Rendah, Aceh: Syiah Kuala University Press.
- Mukhriani, Nonci, F., & Munawarah, S. 2015. Analisis Kadar Flavonoid Total Pada Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Dengan Metode Spektrometri UV-Vis. *Jf Fkik Uinam*, 3(2), 37–42.
- Putri, H. D., Sumpono, S., & Nurhamidah, N. 2019. Uji Aktivitas Asap Cair Cangkang Buah Karet (*Hevea brassiliensis*) Dan Aplikasinya Dalam Penghambatan Ketengikan Daging Sapi. *Alotrop*, 2(2), 97–105.
- Rahman, F. A., Haniastuti, T., & Utami, T. W. 2017. Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*, 3(1), 1.
- Rahmati, R. A., Lestari, T., & Ruswanto. 2020. Penetapan Kadar Total Flavonoid Ekstrak Etanol Dan Fraksi Daun Saliara (*Lantana camara L.*) Dengan Metode Spektrofotometri.
- Rao, M. J., Xu, Y., Tang, X., Huang, Y., Liu, J., Deng, X., & Xu, Q. 2020. *CSCYT75B1, a citrus CYTOCHROME P450 gene, is involved in accumulation of antioxidant flavonoids and induces drought tolerance in transgenic arabidopsis*. *Antioxidants*, 9(2), 1–21.
- Rivai, H., Afriati, A., & Zulharmita. 2020. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif dari Ekstrak Heksan, Aseton, Etanol, dan Air Dari Akar Anting-Anting (*Achalypha indica L.*). *March*, 1–14.
- Rochim, N. A., Hakim, R., & Damayanti, D. S. 2021. Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) Sebagai Pengaktif LDL Receptor dan Penghambat HMG-CoA Reductase secara insilico. *Jurnal Kedokteran Komunitas*, 1–11.
- Vifta, R. L., & Advistasari, Y. D. 2018. Skrining Fitokimia, Karakterisasi, dan Penentuan Kadar Flavonoid Total Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Buah Parijoto (*Medinilla speciosa B.*). *Prosiding Seminar Nasional Unimus*, 1, 8–14.
- Wahyuni, R., Guswandi, & Rivai, H. 2014. Pengaruh Cara Pengeringan Dengan Oven, Kering

Angin dan Cahaya Matahari Langsung Terhadap Mutu Simplisia *Herba Sambilo*.
Fakultas Farmasi Universitas Andalas (UNAND) Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi (STIFARM) Padang, 6(2), 126–133.