

## **PENETAPAN KADAR FLAVONOID DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN PADA EKSTRAK BATANG BROTOWALI (*Tinospora crispa* L.) DENGAN METODE CUPRAC**

**Asep Roni\***, Dewi Kurnia, Nurani Hafsyah  
Fakultas Farmasi Universitas Bhakti Kencana

\*Email: [asep.roni@bku.ac.id](mailto:asep.roni@bku.ac.id)

Artikel diterima: 31 Desember 2021; Disetujui: 15 Maret 2022

DOI: <https://doi.org/10.36387/jiis.v7i1.856>

### **ABSTRAK**

Stres oksidatif adalah kerusakan yang diakibatkan oleh spesi oksigen reaktif. Senyawa yang dapat mencegah terjadinya stres oksidatif yaitu antioksidan. Tanaman brotowali (*Tinospora crispa*) telah digunakan untuk pengobatan diabetes dan hipertensi. Tanaman brotowali mengandung senyawa metabolit sekunder diantaranya yaitu flavonoid. Flavonoid diketahui merupakan golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui aktivitas antioksidan pada batang brotowali yang diekstraksi dengan pelarut berbeda kepolaran, sehingga dapat diketahui jenis pelarut manakah yang paling baik dalam mengekstrak tanaman uji batang brotowali. Ekstraksi dilakukan dengan metode refluks bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 96%. Penetapan aktivitas antioksidan menggunakan metode CUPRAC. Penetapan kadar flavonoid total menggunakan metode aluminium klorida kolorimetri dengan kuersetin sebagai standar. Hasil menunjukkan sampel ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dibandingkan sampel ekstrak dengan etanol 96% dan n-heksana. Nilai EC<sub>50</sub> ekstrak etil asetat sebesar 53,637 µg/mL. Ekstrak dengan pelarut n-heksana memiliki kadar flavonoid paling tinggi yaitu 9,937 ± 0,009 gQE/100 g Ekstrak.

**Kata kunci:** antioksidan, brotowali, CUPRAC, *Tinospora crispa*

### **ABSTRACT**

*Oxidative stress is damage caused by reactive oxygen species. Compounds that can prevent oxidative stress are antioxidants. The brotowali plant (*Tinospora crispa*) has been used for the treatment of diabetes and hypertension. The brotowali plant contains secondary metabolites such as flavonoids. Flavonoids are known to be a class of compounds that have antioxidant activity, so it can be kind of solvent which is the most excellent in the test plant extract brotowali. Extraction was conducted by reflux-rise that use n-hexane, ethyl acetate and ethanol 96%. Determination of antioxidant activity using them CUPRAC method. Determination of total flavonoid content using colorimetric aluminum chloride method with quercetin as standard. The results showed that the ethyl acetate extract sample had strong antioxidant activity*

*compared to the extract sample with 96% ethanol and n-hexane. The EC50 value of the ethyl acetate extract was 53.637 g/mL. Extract with n-hexane solvent had the highest flavonoid content, namely  $9,937 \pm 0.009$  gQE/100 g extract.*

**Keywords:** *antioxidant, brotowali, CUPRAC, Tinospora crispa.*

## **PENDAHULUAN**

Proses penuaan ialah perubahan bertahap yang terjadi dalam tubuh manusia. Penuaan yang terjadi lebih cepat dari pada waktu umurnya disebut penuaan dini. Salah satu penyebab terjadinya penuaan dini adalah karena adanya spesi oksigen reaktif. Spesi oksigen reaktif adalah molekul yang tidak berpasangan, sehingga sangat tidak stabil dan sangat reaktif.. Spesi oksigen reaktif yang paling banyak dipelajari karena memiliki efek berbahaya dan merusak ialah superoksida ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $-OH$ ), dan perhidroksil ( $-OH$ ). Kerusakan akibat spesi oksigen reaktif disebut dengan stress oksidatif. Sumber utama pembentukan spesi oksigen reaktif adalah pencemaran lingkungan, sinar ultraviolet yang berbahaya, ataupun diproduksi secara terus-menerus sebagai hasil dari metabolisme normal didalam tubuh, dll. spesi oksigen reaktif

akan menyebabkan misfolding protein, kerusakan kolagen, kerusakan lipid, kerusakan DNA dan fragmentasi (Manisha, hasan whidul, 2017).

Hasil penelitian Taniyama, 2003 menunjukkan bahwa fungsi dari endothelium dipengaruhi oleh spesi oksigen reaktif yang dapat menginaktivasi nitrik oksida (degradasi  $NO^*$ ). Nitrik oksida bukan radikal yang sangat reaktif, namun produksi berlebihan menyebabkan ischemia reperfusion dan degenerasi syaraf serta penyakit peradangan kronis seperti artritis rematik dan peradangan lambung. Nitrik oksida yang berada pada plasma darah menyebabkan penurunan konsentrasi vitamin C dan asam urat serta memulai peroksidasi lipid. Peroksidasi lipid merupakan degradasi oksidatif lipid dimana target utama terjadi pada membran sel karena memiliki dua lapisan fosfolipid dan protein yang menyebabkan kerusakan pada sel.

Produk hasil oksidasi lipid salah satunya adalah malonaldehid yang dapat bereaksi dengan grup amino protein, fosfolipid, dan asam nukleat yang menyebabkan terjadinya modifikasi struktural yang dapat menyebabkan tidak berfungsinya sistem imun semuanya ini merupakan mekanisme yang mengawali perkembangan atherosclerosis, hipertensi dan penyakit jantung coroner (Muchtadi, 2009).

Berdasarkan uraian tersebut, perlu upaya untuk mencegah terjadinya stres oksidatif yang dapat menyebabkan sejumlah penyakit berbahaya sehingga diperlukan suatu antioksidan. Antioksidan yaitu senyawa yang mampu menghambat oksidasi molekul yang dapat menghasilkan radikal bebas. Terdapat dua jenis antioksidan yaitu antioksidan sintetik dan antioksidan alami.

Salah satu alternatif antioksidan alami yang potensial adalah tanaman brotowali (*Tinospora crisp* L.). tanaman ini termasuk dalam genus *Tinospora* dari keluarga Menispermaceae. Biasanya terdapat

di hutan hujan primer atau hutan gugur campuran di Asia Tenggara dan Afrika termasuk Thailand, Malaysia, dan Indonesia. *T. crisp* telah banyak digunakan sebagai antipiretik, pengobatan peradangan internal, meningkatkan rasa lapar, mengobati keracunan yang disebabkan oleh obat-obat atau alkohol. Di Indonesia tepatnya di daerah Kalimantan telah digunakan untuk pengobatan diabetes dan hipertensi. *T. crisp* memiliki keragaman metabolit sekunder. Sejumlah studi telah dilakukan pada konstituen *T. crisp*, dan lebih dari 65 senyawa telah diisolasi. Kandungan senyawa metabolit sekunder yang telah teridentifikasi diantaranya furanoditerpen, lakton, steroid, flavonoid, lignan, dan alkaloid (Ahmad et al., 2016).

Flavonoid telah diketahui merupakan golongan senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan. Mekanisme kerja flavonoid dalam menangkal radikal bebas yaitu dengan mengikat ion-ion logam seperti Fe dan Cu. Flavonoid juga merupakan antioksidan yang efektif untuk inaktivasi radikal hidroksil dan

peroksid. Flavonoid dapat membentuk ikatan kompleks dengan ion logam dan menghambat inisiasi logam untuk melakukan oksidasi lipid (Muchtadi, 2009). Flavonoid yang teridentifikasi terdapat dalam batang brotowali diantaranya apigenin, luteolin 4'-metileter-7-glukosida, dan diosmetin (Ahmad et al., 2016).

Pengujian antioksidan yang akan dilakukan menggunakan metode uji antioksidan CUPRAC. metode uji antioksidan dengan pereaksi CUPRAC mempunyai keunggulan diantaranya lebih selektif karena potensi redoksnya lebih rendah, kemudian reaksi redoks yang menimbulkan kelat berwarna Cu (I) -Ne relatif tidak sensitif terhadap sejumlah parameter yang mempengaruhi reagen radikal tertentu seperti DPPH yaitu udara, sinar matahari, jenis pelarut, dan pH (Apak et al., 2007). Maka dari itu, perlu dilakukan pengujian dengan pelarut yang berbeda yang dapat mengekstraksi jenis golongan senyawa yang berbeda yang terkandung dalam batang brotowali, sehingga diharapkan dapat

mengetahui jenis pelarut paling baik untuk ekstraksi yang dapat menghasilkan aktivitas antioksidan paling tinggi dengan menggunakan metode CUPRAC

## **METODE PENELITIAN**

Metodologi penelitian yang digunakan dalam penelitian ini meliputi penyiapan bahan, karakterisasi simplisia, penapisan fitokimia, ekstraksi, pengujian aktivitas antioksidan ekstrak batang brotowali dengan metode CUPRAC menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis, Pengolahan data dan analisis statistik.

Penyiapan bahan meliputi pengumpulan bahan yang akan digunakan, determinasi, pengolahan bahan sampai jadi simplisia.

Karakterisasi simplisia meliputi pemeriksaan spesifik dan non spesifik antara lain kadar abu total, abu tidak larut asam, kadar sari larut air, sari larut etanol, kadar air dan susut pengeringan. Penapisan fitokimia meliputi pemeriksaan terhadap beberapa senyawa seperti alkaloid,

flavonoid, tanin, saponin, kuinon dan steroid.

Ekstraksi dilakukan dengan cara refluks bertingkat menggunakan pelarut n-Heksan, etil asetat dan metanol. Ekstraksi dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali yang masing-masing dilakukan selama 3 jam. Kemudian ekstrak dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

Penetapan kadar flavonoid total dari bahan uji dihitung terhadap kurva kalibrasi quercetin sebagai standar. Uji Aktivitas antioksidan dilakukan dengan pengujian uji kualitatif senyawa yang terkandung dalam bahan uji menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dan pengujian kuantitatif dengan metode CUPRAC yang dilihat berdasarkan tingkat absorbansi Cu (I)-neocuproine yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Pembuatan dan Karakterisasi simplisia**

Penyiapan simplisia batang brotowali diawali dengan proses

sortasi basah. Sortasi basah bertujuan untuk memisahkan tanaman dari kotoran dan polutan lain yang terbawa selama pengumpulan atau pemanenan. Tahap selanjutnya yaitu pencucian tanaman di bawah air mengalir untuk menurunkan jumlah mikroba awal. Kemudian dilakukan proses perajangan yang bertujuan untuk memudahkan proses ekstraksi yaitu dengan cara memperkecil ukuran tanaman sehingga dapat memperluas permukaannya kontak dengan pelarut. Setelah dilakukan proses perajangan simplisia dikeringkan di bawah sinar matahari tidak langsung hal tersebut dilakukan untuk mengurangi kerusakan bahan aktif yang memiliki aktivitas antioksidan yang terkandung dalam simplisia. Karakterisasi simplisia dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kualitas dan mutu simplisia yang digunakan.

Parameter yang bisa digunakan antara lain kadar air, kadar abu total, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, dan susut pengeringan. Hasil Karakterisasi

simplisia dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini.

**Tabel 1.** Hasil Karakterisasi Simplisia

Uji Karakterisasi	Hasil Pengamatan % (B/B)
Susut Pegeringan	10,68%
Kadar Abu Total	4,70%
Kadar Abu Tidak Larut Asam	0,35%
Kadar Sari Larut Air	4,98%
Kadar Sari Larut Etanol	5,48 %
Kadar Air	7,28%

### Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia/ penapisan fitokimia bertujuan untuk mengetahui golongan-golongan senyawa yang terdapat didalam simplisia. Pemeriksaan ini meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, kuinon, tanin, dan sponin. Hasil Skrining fitokimia dapat dilihat pada tabel 2 berikut ini :

**Tabel 2.** Hasil Penapisan Fitokimia Simplisia

Golongan Senyawa	Hasil Pengamatan
Alkaloid	+
Flavonoid	-
Saponin	+
Kuinon	-
Terpenoid/steroid	+
Tanin	-

### Ekstraksi

Ekstraksi yang dilakukan pada simplisia batang brotowali sebanyak 301,34 gram menggunakan metode

refluks dengan cara ekstraksi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol berdasarkan kepolarannya.

Dari hasil ekstraksi, pengamatan ekstrak secara organoleptik antara ekstrak dan fraksi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dimana ekstrak berwarna hijau kehitaman, sedangkan fraksi masing kepolaran pun berwarna hijau kehitaman dan bertekstur pekat

**Tabel 3.** Hasil Rendemen Ekstrak

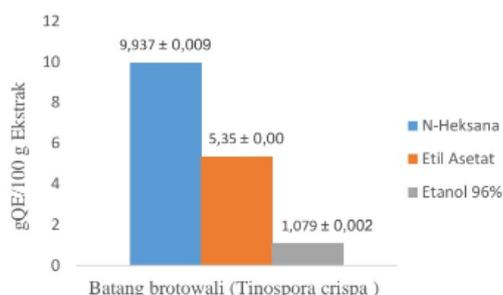
Pelarut	Ekstrak Kental (Gram)	Randemen Ekstrak (Gram)	Organo-leptik
N – Heksana	5,69	1,88	Pekat, Hijau kehitaman
Etil Asetat	7,30	2,42	Pekat, Hijau kehitaman
Etanol 96%	19,31	6,41	Pekat, Hijau kehitaman

### Penetapan Kadar Flavonoid

Penetapan kadar flavonoid total terhadap sampel dilakukan dengan metode kolorimetri aluminium klorida. Prinsip metode tersebut adalah aluminium klorida membentuk kompleks asam yang stabil dengan gugus keto C-4 dan gugus hidroksil C-3 atau C-5 dari flavon dan flavonol. Selain itu,

membentuk kompleks asam labil dengan gugus orto-dihidroksil pada cincin A atau B dari flavonoid. Salah satu senyawa flavonoid golongan flavonol yang dapat bereaksi dengan aluminium klorida adalah kuersetin. Maka dari itu kuersetin digunakan sebagai standar untuk penetapan kadar flavonoid total.

Perubahan reaksi yang terjadi pada senyawa flavonoid dalam sampel dan aluminium klorida diidentifikasi melalui absorbansi pada panjang gelombang 415 nm menggunakan spektrofotometr Vis. Semakin tinggi kandungan senyawa flavonoid pada sampel maka semakin tinggi nilai absorbansinya. Selain itu, secara visual perubahan warna kuning yang terbentuk akan semakin pekat.



**Gambar 1.** Kadar Flavonoid Total

Dari hasil percobaan, sampel yang kandungan flavonoid total

paling tinggi berturut -turut adalah sampel yang menggunakan pelarut N-heksana kemudian sampel dengan pelarut etil asetat dan yang paling rendah sampel dengan pelarut etanol 96%. Urutan sampel pada kandungan flavonoid total berbeda dengan urutan kandungan fenol total, hal ini dapat dikarenakan tingginya kandungan fenol pada sampel etil asetat tidak hanya disebabkan oleh golongan flavonoid saja. Perbedaan tersebut dapat disebabkan karena metode kolorimetri aluminium klorida kurang sensitif dalam menguji golongan flavonoid. Aluminium klorida dapat mengkompleks beberapa kelompok flavonoid seperti flavon (Krisin, apigenin dan luteolin) dan flavonol (kuersetin, mirisetin, morin, dan rutin) tetapi tidak dapat mengkompleks golongan flavanon dan flavanonol (Widyastuti, 2010).

### Uji Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dilakukan dengan metode CUPRAC, dimana metode ini memiliki prinsip yaitu kompleks bisneokuproin-tembaga (II) akan mengoksidasi senyawa antioksidan yang

terkandung dalam ekstrak tanaman dan mengalami reduksi sehingga membentuk kompleks bis-neokuproin-tembaga(I). perubahan reaksi tersebut ditandai dengan warna kompleks larutan dari biru toska menjadi kuning (Widyastuti, 2010).

Metode CUPRAC dipilih sebagai metode uji kuantitatif aktivitas antioksidan karena pereaksi CUPRAC lebih stabil dibandingkan metode antioksidan yang lain, lebih selektif karena memiliki potensi redoksnya lebih rendah, dan memiliki reaksi yang cukup cepat untuk mengoksidasi tiol jenis antioksidan. Uji aktivitas antioksidan dilakukan pada sampel dan baku pembanding. Pembanding yang digunakan yaitu vitamin C. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Irianti uji aktivitas penangkapan radikal DPPH pada ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L) memiliki aktivitas terbaik pada fraksi etil asetat dengan konsentrasi 200  $\mu\text{g/mL}$  berhasil menangkap sebesar 53,57% radikal bebas (Irianti et al., 2011)

**Tabel 4.** Hasil Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode CUPRAC

Ekstrak Batang Brotowali	EC50 (g/mL)
N – Heksana	161,954 $\pm$ 0,169
Etil Asetet	53,637 $\pm$ 0,180
Etanol 96%	87,540 $\pm$ 0,556

Berdasarkan nilai EC<sub>50</sub> tiap sampel ekstrak pada Tabel V.6 sampel pada ekstrak batang brotowali dengan pelarut Etil asetat dan Etanol 96% memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dimana pada ekstrak batang brotowali dengan pelarut etil asetat memiliki nilai EC<sub>50</sub> sebesar 53,637  $\mu\text{g/mL}$  dan nilai EC<sub>50</sub> ekstrak batang brotowali dengan pelarut etanol 96% sebesar 87,540  $\mu\text{g/mL}$ . sedangkan ekstrak batang brotowali dengan pelarut N-heksana memiliki aktivitas antioksidan yang lemah dengan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 161,954  $\mu\text{g/mL}$ .

## KESIMPULAN

Hasil penelitian aktivitas antioksidan batang brotowali dengan metode CUPRAC dapat disimpulkan bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat adalah ekstrak dengan pelarut etil asetat dengan nilai EC<sub>50</sub> yang lebih besar

yaitu 53,637  $\mu\text{g/mL}$ . Ekstrak dengan pelarut n-heksana memiliki kadar flavonoid paling tinggi yaitu  $9,937 \pm 0,009 \text{ gQE/100 g}$  Ekstrak.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Fakultas Farmasi dan Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Bhakti Kencana, atas dukungannya dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Choma., Irena, M.,Edyta, M.G. 2010. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A* Chroma-351708.
- Dirjen POM. Farmakope Indonesia, Edisi IV. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 1995. Hal 7
- Harborne, J.B. Metode Fitokimia. Penuntun Cara modern

mengekstraksi Tumbuhan (Koasish Padmawinata dan Iwang Soediro, penerjemah). Bandung: ITB, 1987. Hal 103-104

- Heyne, K., 1987, Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid Ketiga, Departemen kehutanan Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Yayasan Sarana Wahana Jaya (Penterjemah), Jakarta.
- Irianti, T., Puspitasari, A., & Suryani, E. (2011). The Activity Of Radical Scavenging Of 2,2-Diphenyl-1-Pyrcilhydrazil By Ethanolic Extracts Of (*Tinospora Crispa* (L.) Miers) Stem And Its Fractions. *Majalah Obat Tradisional*, 16(3), 139–146.
- Markham KR. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Bandung : Penerbit ITB. 1988. Hal 58-60
- Mursyidi, A., 1990, Analisis Metabolit Sekunder, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, 175-180