



**PENENTUAN KANDUNGAN FLAVONOID DAN UJI AKTIVITAS ANTIOKSIDAN  
FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK KULIT BATANG *Sterculia foetida* L. DENGAN  
METODE 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)**

Theodore Y. K. Lulan<sup>1\*</sup>, Maria Yuliana Soi<sup>1</sup>, Fidelis Nitti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Nusa Cendana, Kupang

\*Corresponding author, email: [theodore\\_lulan@staf.undana.ac.id](mailto:theodore_lulan@staf.undana.ac.id)

### ABSTRACT

This study has been conducted with the aim of determining the class of compounds contained in the methanol extract of the stem bark of *Sterculia foetida* L. As well as the total flavonoid content in the ethyl acetate fraction of the methanol extract of the stem bark of *Sterculia foetida* L. By *UV-Vis spectrofotometric* method and antioxidant activity by 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) method. The results showed that the content of triterpenoids/steroids, flavonoids, and tannins in the methanol extract of *S. foetida* extract was 10,99 ±1,56 mg QE/g extract, while the antioxidant activity test of the ethyl acetate fraction was 51,571% with an IC<sub>50</sub> value of 92,04 ppm.

**Keywords:** *Sterculia foetida* L., Flavonoid, Antioxidant, ABTS

### ABSTRAK

Penelitian ini telah dilakukan dengan tujuan untuk menentukan golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L. serta total kandungan flavonoid dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L. dengan metode *spektrofotometri UV-Vis* dan aktivitas antioksidan dengan metode 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). Hasil penelitian menunjukkan bahwa adanya kandungan triterpenoid/steroid, flavonoid dan tanin dalam ekstrak metanol *S. foetida*. Kandungan flavonoid total pada fraksi etil asetat ekstrak *S. foetida* sebesar 10,99 ±1,56 mg QE/g ekstrak, sedangkan untuk uji aktivitas antioksidan dari fraksi etil asetat sebesar 51,571% dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 92,04 ppm.

**Kata Kunci:** *Sterculia foetida* L., Flavonoid, Antioksidan, ABTS

### PENDAHULUAN

Perkembangan penggunaan tumbuhan sebagai obat tradisional untuk menanggulangi masalah kesehatan masyarakat yang dilakukan sejak zaman dahulu hingga sekarang sudah cukup meluas sehingga penelitian kearah obat-obatan tradisional semakin meningkat, hal ini diuntungkan karena efek samping obat tradisional lebih kecil dan harganya lebih ekonomis dibandingkan obat modern (Hariana, 2004). Menurut Ersam (2001) letak geografis Indonesia yang beriklim tropis dan memiliki rata-rata curah hujan tinggi di seluruh wilayahnya menyebabkan ditemukannya sekitar 30.000 jenis tumbuhan yang sebagiannya berkhasiat sebagai obat salah satunya *S. foetida* yang dikenal masyarakat luas khususnya NTT dengan nama Nitas (Njurumana, 2011; Lulan, dkk 2018).

Pemanfaatan tumbuhan *S. foetida* banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional dalam menyembuhkan berbagai penyakit. Dalam penelitian Metananda, dkk (2020) tumbuhan ini secara tradisional dapat digunakan untuk menyembuhkan penyakit medis seperti malaria, muntah darah, kencing batu, penyubur rambut, penawar racun, penyembuhan pasca melahirkan maupun non medis seperti menangkal gangguan makhluk halus dan berbagai bentuk sihir. Pemanfaatan kulit, batang, akar dan daun *S. foetida* oleh masyarakat NTT juga digunakan

dalam pemenuhan kebutuhan hidup antara lain bahan pengawet benih pertanian, pakan ternak, mengatasi kesulitan persalinan, menyembuhkan sakit lambung, ginjal, berbagai kerajinan tangan dan obat-obatan (Njrumana, 2011). Secara ilmiah pun tumbuhan *S. foetida* telah terbukti mempunyai aktivitas sebagai antiinflamasi dan analgesik (Maryanti, 2014; Lulan, dkk 2020). Dalam penelitian Shivarkumar dan Vidyasagar (2014) *S. foetida* merupakan sumber metabolit sekunder, juga terkenal karena kandungan fenolik, seperti untuk kegiatan antibakteri dan antioksidan.

Senyawa flavonoid adalah senyawa fenolik yang memiliki sifat antioksidan yang berperan dalam menangkal radikal bebas. Antioksidan merupakan senyawa yang bertindak sebagai *inhibitor* yang berkerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil, radikal bebas reaktif tersebut dapat menyebabkan peradangan dan penuaan dini (Sofia, 2005; Lulan, dkk 2018). Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang sebagian besar terdapat pada tumbuhan. Salah satunya *S. foetida*, yakni terdapat pada bagian organ tumbuhan antara lain daun, buah, bunga, biji, kulit batang dan akar. Hal ini dapat dibuktikan dalam penelitian (Prakash, dkk 2012) menyatakan bagian tumbuhan *S. foetida* yang dimanfaatkan sebagai obat adalah kulit batang, buah dan biji memiliki senyawa kimia yang terkandung di dalamnya antara lain, flavonoid, saponin, polifenol, tannin, dan triterpenoid. Menurut Bawa (2010) hasil uji antiradikal bebas menunjukkan minyak dari ekstrak n-heksana daging biji *S. foetida* tidak berpotensi sebagai agen antiradikal bebas, sedangkan minyak dari ekstrak etanol berpotensi sebagai agen antiradikal bebas dengan presentase perendaman pada menit ke-5 sebesar 55,07% dan menit ke-60 sebesar 85,05%. Dalam penelitian Gunawan dan Karda (2015) menunjukkan bahwa minyak atsiri hasil ekstrak fraksi etanol kulit batang *S. foetida* memiliki aktivitas antioksidan dengan presentase perendaman pada menit ke-5 sebesar 50,29% dan menit ke-60 sebesar 97,11%.

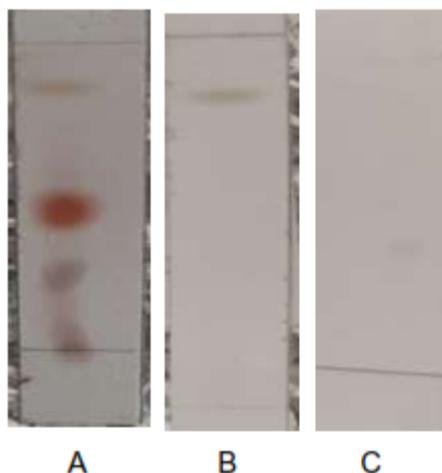
Penelitian tentang isolasi senyawa antioksidan ekstrak metanol kulit batang *S. foetida* diketahui bahwa fraksi etil asetat merupakan fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan yang kuat untuk menghambat radikal bebas DPPH dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 38,54 ppm (Nahak, 2023). Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antioksidan dengan fraksi yang sama tapi menggunakan metode 2,2-Azino-bis(3-ethyl benzothia zoline-6-zulfonic acid) (ABTS). Metode ABTS dipilih karena memiliki kelebihan yaitu dapat digunakan pada sistem larutan berbasis air maupun organik yang bersifat polar, semi polar dan non polar, stabil, membutuhkan waktu reaksi yang singkat serta sensitivitas lebih tinggi dari pada DPPH dan dapat dipakai untuk menganalisa antioksidan pada makanan (Fitriana, dkk 2015). Berdasarkan data-data yang diperoleh dari berbagai referensi belum banyak ditemukan penelitian ilmiah yang mengkaji tentang fraksi etil asetat ekstrak tumbuhan *Sterculia foetida* L. memiliki aktivitas antioksidan dengan metode ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethyl benzothia zoline-6- sulfonic acid)). Oleh karena itu peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul Penentuan Kandungan Flavonoid dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat

Ekstrak Kulit Batang *Sterculia foetida* L. dengan metode 2,2-azino-bis(3-ethyl benzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Preparasi dan Ekstraksi sampel *Sterculia foetida* L.

Penelitian ini menggunakan kulit batang tumbuhan *Sterculia foetida* L. sebagai sampel yang diambil dari Desa Oenun Tono, Kecamatan Amabi Oefeto Timur, Kabupaten Kupang. Pada tahap awal dilakukan preparasi sampel berupa pembersihan, pemotongan, pengeringan, penghalusan dan pengayakan. Sampel kulit batang *S. foetida* dibersihkan dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran seperti tanah, debu maupun pengotor lainnya yang menempel pada sampel. Tujuan sampel di potong kecil-kecil agar memperbesar luas permukaan sehingga mempermudah proses pengeringan dimana sampel dikeringanginkan pada suhu kamar selama  $\pm$  7 hari dengan tujuan agar senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam sampel tidak mengalami kerusakan. Proses penghalusan kulit batang *S. foetida* bertujuan untuk memperbesar luas permukaan sampel agar mempermudah proses penarikan senyawa-senyawa aktif pada saat ekstraksi yang kemudian diayak menggunakan ayakan 40 mesh untuk menghomogenkan ukuran sampel. Hasil yang diperoleh dari proses preparasi sampel kulit batang *S. foetida* sebesar 900 gram. Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Metode maserasi merupakan proses perendaman bahan dengan pelarut organik yang sesuai dengan senyawa aktif yang diambil tanpa adanya proses pemanasan sehingga menghindari rusaknya senyawa yang bersifat termolabil (Asworo dan Widwastuti, 2023). Proses maserasi dengan pelarut metanol dilakukan selama 3x24 jam yang dianggap sebagai waktu paling efektif untuk mengekstrak fitokonstituen yang terdapat dalam kulit batang *S. foetida*. Pada waktu 24 jam pertama bercak noda yang tampak pada plat KLT sangat tebal dan semakin sedikit bercak nodanya pada waktu 24 jam ketiga seperti yang terlihat pada gambar 4.1. Menurut Hidayatika (2015) penampakan noda pada plat KLT menunjukkan banyaknya konsentrasi senyawa yang terekstrak oleh pelarut. Semakin tebal penampakan noda pada plat KLT maka semakin besar konsentrasi senyawa yang terekstrak oleh pelarut demikian pula semakin tipis penampakan noda pada plat KLT maka semakin kecil konsentrasi yang terekstrak oleh pelarut.



### Keterangan Gambar

Eluen yang digunakan yakni etil asetat : n-heksan (3:7)

- A. KLT maserat hari ke-1
- B. KLT maserat hari ke-2
- C. KLT maserat hari ke-3

**Gambar 1.** KLT setelah di semprot H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10%

Sebanyak 900 gram serbuk kulit batang *S. foetida* dimaserasi dengan pelarut metanol 3000 mL. Proses maserasi pada hari pertama, kedua dan ketiga masing-masing menggunakan pelarut metanol sebanyak 1000 mL dengan hasil maseratnya berwarna merah kecoklatan (hari pertama), kuning kecoklatan (hari kedua), dan bening (hari ketiga). Maserat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *rotary vakum evaporator* sehingga hasil yang diperoleh berupa ekstrak metanol pekat sebanyak 9,4 gram dengan berat maserat berturut-turut dari hari pertama hingga hari ketiga adalah 5,4 gram, 2,6 gram dan 1,4 gram.

### Uji Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sampel. Senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit sekunder (Harborne, 1987). Hasil skrining fitokimia pada ekstrak metanol *Sterculia foetida* L. dapat di lihat pada tabel 1

**Tabel 1.** Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L.

Golongan Senyawa	Hasil Uji	Keterangan
Alkaloid	Reagen wagner: warna larutan merah bata	-
Triterpenoid/Steroid	Terbentuk cincin berwarna ungu/hijau	+
Flavonoid	Buih larutan berwarna merah jingga	+
Saponin	Tidak terbentuk busa dan warna larutan cokelat	-
Tanin	Warna larutan hijau kehitaman	+

Keterangan: (+) = mengandung senyawa metabolit sekunder, (-) = tidak mengandung senyawa metabolit sekunder

### Fraksinasi Etil Asetat

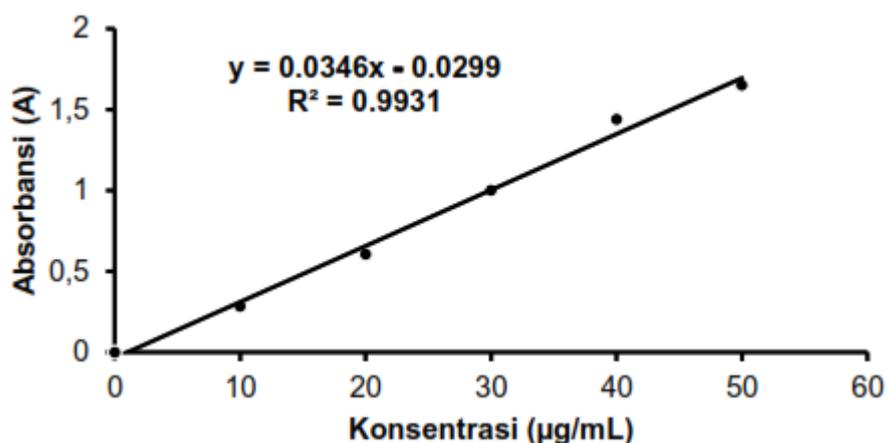
Fraksinasi adalah proses pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Metode pemisahan yang digunakan adalah fraksinasi cair-cair yaitu pemisahan dengan menggunakan

dua cairan pelarut yang tidak saling bercampur berdasarkan perbedaan massa jenis sehingga senyawa yang diinginkan dapat terpisah. Pelarut yang umumnya digunakan untuk fraksinasi antara lain n-heksan, etil asetat dan metanol (Mutiasari, 2012).

Ekstrak pekat metanol kulit batang *S. foetida* terlebih dahulu dilarutkan dalam metanol, partisi dilakukan sebanyak 3 kali untuk pelarut n-heksan menggunakan corong pisah. Pelarut n-heksan akan memisahkan senyawa-senyawa nonpolar seperti triterpenoid, lemak, klorofil dan senyawa nonpolar lain sehingga memudahkan untuk mendapatkan senyawa flavonoid (Ritna, 2016). Hasil pemisahannya ditampung dan fraksi metanol yang diperoleh selanjutnya dipartisi lagi dengan pelarut etil asetat sebanyak 3 kali agar semua metabolit sekunder yang dapat larut dengan etil asetat dapat tertarik sempurna. Hasil fraksinasi etil asetat dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk memisahkan pelarut dari fraksinya sehingga diperoleh fraksi pekat sebanyak 0,7 gram.

### Penentuan Kandungan Total Triterpenoid

Pada penelitian ini untuk menentukan kadar flavonoid total dalam ekstrak *S. foetida* diukur dengan standar kuersetin (mg/g). Kuersetin dipakai sebagai larutan standar karena merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus keto pada C-4 dan memiliki gugus hidroksil pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari flavon dan flavonol (Azizah & Faramayuda, 2014). Hasil pengukuran kurva kalibrasi kuersetin sebagai standar dapat dilihat pada gambar 2 Dari variasi konsentrasi masing-masing diperoleh data dalam bentuk grafik hubungan antara konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ ) dan absorbansi (A) dengan persamaan regresi linear yaitu  $y = 0,0346x - 0,0299$  dan nilai  $R^2 = 0,9931$



**Gambar 2.** Grafik kurva standard kuersetin

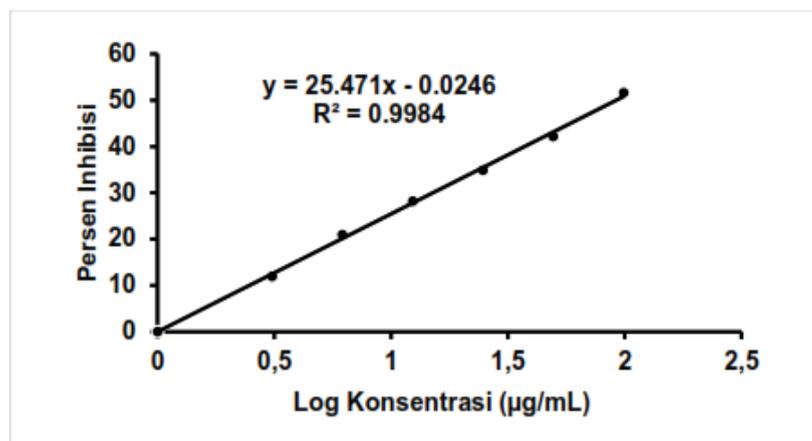
**Tabel 2.** Nilai kandungan total Flavonoid

Sampel	Absorbansi	Konsentrasi (mg/mL)	TFC (mg QE/g ekstrak)
	0,3	9,353	

	0,402	12,483
Ekstrak etil	0,355	11,124
		10,987
Rata-rata	0,35233	10,99 ± 1,56

### Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat dengan Metode ABTS

Aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit batang *S. foetida* dilakukan dengan menggunakan metode ABTS (2,2-Azino-bis(3-ethyl benzothiazolone-6-sulfonic acid)). Metode ABTS merupakan salah satu metode penentuan aktivitas antioksidan dalam suatu sampel yang diperoleh dari hasil oksidasi kalium persulfat dengan garam diammonium ABTS. Aktivitas antioksidan dapat ditandai dengan hilangnya warna biru dari pereaksi ABTS (Molyneux, 2004). ABTS dalam penelitian ini berfungsi sebagai radikal bebas. Kemudian ABTS direaksikan dengan kalium persulfat sebagai zat pengoksidasi untuk menghasilkan radikal bebas ABTS. Radikal bebas ABTS yang dihasilkan direaksikan dengan sampel. Besarnya aktivitas antioksidan ditandai dengan nilai IC50. Nilai IC50 menunjukkan nilai konsentrasi larutan sampel yang dibutuhkan untuk meredam 50% aktivitas radikal bebas ABTS.



**Gambar 3.** Grafik Hubungan antara Konsentrasi Sampel dengan Persen Inhibisi

Berdasarkan analisis data dan perhitungan diperoleh nilai persen penghambatan sebesar 51,571% pada konsentrasi 99,010 µg/mL dan analisis antara konsentrasi fraksi etil asetat dan ekstrak kulit batang *S. foetida* dengan persen perendaman absorbansi ABTS diperoleh persamaan regresi linear  $Y = 25,471x - 0,0246$  dengan  $R^2 = 0,9984$ . Selanjutnya dihitung nilai *inhibitor concentration 50%* (IC50). Nilai IC50 pada fraksi etil asetat ekstrak kulit batang tumbuhan *S. foetida* sebesar 92,0412 µg/mL. Menurut Molyneux (2004) menunjukkan bahwa suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai IC50 < 50 ppm, kuat 50 ppm-100 ppm, sedang 100 ppm-150 ppm, lemah 150 ppm-200 ppm, dan sangat lemah >200 ppm. Berdasarkan nilai IC50 yang diperoleh sebesar 92,0412 µg/mL dapat dikategorikan sebagai antioksidan kuat karena nilainya 50-100 ppm. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi

92,0412 µg/mL fraksi etil asetat ekstrak kulit batang *Sterculia foetida* L. dapat menghambat radikal ABTS sebesar 50%.

## KESIMPULAN

1. Ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L. mengandung beberapa golongan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, triterpenoid/steroid dan tanin.
2. Total kandungan flavonoid dalam fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L. sebesar  $10,99 \pm 1,56$  mg QE/g ekstrak.
3. Total kemampuan aktivitas antioksidan fraksi etil asetat ekstrak metanol kulit batang *Sterculia foetida* L. sebesar 51,571% dan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 92,0412 µg/mL

## DAFTAR PUSTAKA

1. Asworo, R. Y., & Widwastuti, H. 2023. Pengaruh Ukuran Serbuk Simplisia dan Waktu Maserasi terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kulit Sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical (e-journal)*, 3(2): 256-263
2. Azizah, D. N., & Faramayuda, F. 2014. Penetapan Kadar Flavonoid Metode AlCl<sub>3</sub> Pada Ekstrak Metanol Kulit Buah Kakao (*Theobroma Cacao* L.). *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*,2(2):
3. Bawa, I.G.A. 2010. Analisis Senyawa Antiradikal Bebas Pada Minyak Daging Biji Kepuh (*Sterculia foetida* L.). *Jurnal Kimia*, 4(1)
4. Ersam, T. 2001. Senyawa Kimia Mikromolekul Beberapa Tumbuhan Artocarpus Hutan Tropika Sumatera Barat, Bandung.
5. Fitriana, W. D., Fatmawati, S., & Eram, T. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan terhadap DPPH dan ABTS dari fraksi-fraksi daun kelor (*Moringa oleifera*). Prosiding Simposium nasional Inovasi dan Pembelajaran Sains. 657-660.
6. Gunawan, I. W. G., & Karda, I. M. 2015. Identifikasi senyawa minyak atsiri dan uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol kulit batang Kepuh (*Sterculia foetida* L.). *Chemistry Progress*, 8(1):
7. Harborne, J. B., 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan,49-51, Bandung, ITB Press.
8. Hariana, H. A. 2004. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya, Seri I, Swadaya, Jakarta.
9. Hidayatika, U. N. 2015. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Antioksidan dari Ranting *Garcinia balica*. Skripsi Institut Teknologi Sepuluh Nopember
10. Lulan *et al*, 2022. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan *Sterculia foetida* L. *Jurnal Ilmiah Berkala: Sains dan Terapan Kimia*. 16(2):
11. Lulan, T. Y. K., Fatmawati, S., Santosos, M., Ersam, T. 2018. Antioxidant Capacity of Some Selected Medicinal Plants in East Nusa Tenggara, Indonesia: The Potential of *Sterculia quadrifida* R. Br.. *Free Radicals and Antioxidant*. 8(2): 96-101.
12. Lulan, T. Y. K., Fatmawati, S., Santosos, M., Ersam, T. 2018. Free Radical Scavenging Activity of *Artocarpus champeden* Extracts. AIP Conference Proceedings.

13. Maryanti, A., & Rina, H. L. 2014. Budidaya Kepuh (*Sterculia foetida* Linn) untuk Antisipasi Kondisi Kering. Kepala Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan, IPB Press: Bogor
14. Metananda, A. A., Zuhud, E. A., Hikmat, A., Qomar, N., Yoza, D., Masruri, N. W., & Darlis, V.V. 2020. Etnobotani Kepuh (*Sterculia foetida* L.) Masyarakat Etnis Samawa di Kabupaten Sumbawa, Nusa Tenggara Barat. *Jurnal Ilmu-Ilmu Kehutanan*, 6(2):
15. Molyneux, R. 2004. The Use of Stable Free Radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Songklanakarin Journal of Sciences*, 2: 211-219.
16. Mutiasari, I. R. 2012. Skripsi: Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jamur *Pleurotus ostreatus* dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Fraksi Teraktif. FMIPA-UI, Jakarta
17. Nahak, Y., Lulan, T. Y. K., & Kadang, L. 2023. Skripsi: Penentuan Kandungan Fenolat dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Kulit Batang *Sterculia foetida* L. dengan Metode 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH). Universitas Nusa Cendana Kupan
18. Njurumana, G. N. 2011. Ekologi dan Pemanfaatan Nitas (*Sterculia foetida* L.) di Kabupaten Timor Tengah Selatan, Nusa Tenggara Timur. *Jurnal Penelitian Hutan Dan Konservasi Alam*, 8(1):
19. Prakash, Y. G., Gopal, V., & Kaviarasan, L. 2012. Promising Pharmaceutical Prospective Of 'Java Olive'—*Sterculia Foetida* Linn (*Sterculiaceae*). *International Journal Of Pharmacy Review & Research*, 2(2)
20. Ritna, A., Anam, S., & Khumaidi, A. 2016. Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Fraksi Etil Asetat Benalu Batu (*Begonia* sp.) Asal Kabupaten Morowali Utara. *Journal of Pharmacy*, 2(2):
21. Shivarkumar, S. P. & Vidyasagar, G. M. 2014. Green Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles by Using *Sterculia foetida* L. young Leaves Aqueous Extract. *International Journal of Green Chemistry and Bioprocess*, 4(1)
22. Sofia, D. 2003. Antioksidan dan Radikal Bebas. (Artikel). F-MIPA Universitas Lampung: Lampung.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik, bejana maserasi, corong, desikator, pengaduk, alat- alat gelas pipet tetes, pipet volum, rak tabung, ayakan 40 mesh, labu takar, botol vial, batang pengaduk, corong, blender, alumunium foil, *rotary vakum evaporator*, kromatografi lapis tipis (KLT), dan spektrofotometer UV-VIS.

Bahan-bahan yang digunakan adalah kulit batang tumbuhan *Sterculia foetida* L., n- heksana, metilen klorida, etil asetat, metanol, logam Mg, serium sulfat, HCl pekat, NaCl, pereaksi wagner, asam asetat anhidrat, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, FeCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub>, NaOH, aquades, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>6</sub> dan etanol

## **Prosedur Kerja**

### **Persiapan sampel**

Sampel kulit batang *S. foetida* yang diperoleh dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir, setelah itu dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan. Kemudian dihaluskan hingga berbentuk serbuk, dan diayak menggunakan ayakan 40 mesh.

### **Ekstraksi sampel**

Metode yang digunakan pada ekstraksi kulit *Sterculia foetida* L. adalah metode maserasi selama 3x24 jam terhadap sampel tumbuhan *Sterculia foetida* L. sebanyak 900 gram dengan pelarut metanol sebanyak 3 L. Setiap 24 jam sekali diambil hasil ekstrak dan pelarut metanol diganti dengan yang baru kemudian diamati dengan KLT. Disaring hasil ekstrak metanol untuk memperoleh ekstrak cair yang terpisah dari residu. Kemudian pelarutnya dipisahkan dengan menggunakan *rotary vakum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat berat ekstrak

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat serbuk}} \times 100\%$$

## **Uji Kualitatif Fitokimia**

**Metode yang digunakan dalam skrining fitokimia ini didasarkan pada metode Ciulei (1984).**

### **a) Alkaloid**

Sebanyak 3 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL HCl 2 M lalu dipanaskan 2-3 menit sambil diaduk dan kemudian didinginkan pada suhu ruangan. Setelah sampel dingin ditambahkan 0,5 g NaCl lalu diaduk dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan HCl 2 M sebanyak 3 tetes, kemudian dipisahkan menjadi dua bagian A dan B. Filtrat A sebagai blanko dan filtrat B ditambah pereaksi Wagner. Apabila terbentuk endapan pada penambahan pereaksi Wagner maka identifikasi menunjukkan adanya senyawa alkaloid.

### **b) Triterpenoid/Steroid**

Ekstrak diuapkan hingga kering, kemudian residu yang dihasilkan dilarutkan dalam kloroform (0,5 mL), lalu ditambah dengan 3 tetes pereaksi *Lieberman-Burchard* (asam asetat+ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat) melalui dinding tabung reaksi tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan munculnya warna hijau atau biru menunjukkan adanya steroid.

### **c) Flavonoid**

Ekstrak diuapkan hingga kering, kemudian dilarutkan dalam metanol panas 50% (12 mL). Setelah itu ditambahkan logam Mg dan HCl pekat (45 tetes). Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid

### **d) Saponin**

Ekstrak dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 5 menit. Adanya busa yang dapat bertahan selama 30 menit menunjukkan adanya senyawa saponin.

#### **e) Tanin**

0,5 gram ekstrak kering dilarutkan dengan 20 mL air dalam tabung reaksi, lalu dipanaskan kemudian disaring. Selanjutnya ditambahkan 10 tetes  $\text{FeCl}_3$  0,1% dan diamati warna yang terbentuk. Hasil positif jika ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman.

#### **Fraksinasi Ekstrak metanol *Sterculia foetida* L.**

Ekstrak pekat yang diperoleh dari tahapan ekstraksi selanjutnya dilarutkan dalam metanol dan dipisahkan dengan corong pisah menggunakan pelarut n-heksan dan etil asetat. Kemudian hasil pemisahannya ditampung dan fraksi etil asetat yang diperoleh selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh fraksi yang pekat.

#### **Penentuan Kandungan Total Flavonoid**

##### **Pembuatan larutan stok kuersetin 400 ppm**

Larutan induk kuersetin 400 ppm dibuat dengan cara ditimbang 20 mg kuersetin dan dilarutkan dengan pelarut metanol dalam labu takar 50 mL.

##### **Pembuatan Kurva Kalibrasi Kuersetin**

Dibuat variasi konsentrasi larutan induk 400 ppm dengan cara dipipet larutan induk sebanyak 0,62 mL; 1,25 mL; 1,9 mL; 2,5 mL ; 3,12 mL dimasukkan dalam labu ukur dan ditambahkan metanol hingga 25 mL sehingga dihasilkan larutan baku 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm dan 50 ppm. Dari masing-masing variasi konsentrasi dipipet sebanyak 2 mL dimasukkan dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan dengan 5 mL aquades dan 0,3 mL  $\text{NaNO}_2$  kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 6 menit. Selanjutnya ditambahkan sebanyak 0,3 mL  $\text{AlCl}_3$  10% kedalam larutan dan didiamkan lagi dengan aquades hingga volume total 10 mL dan didiamkan selama 15 menit dan diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum.

##### **Uji Total Kandungan Flavonoid (TFC)**

Ditimbang 0,01 gram fraksi etil asetat pekat dilarutkan dengan metanol hingga 10 mL sehingga diperoleh larutan dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Sebanyak 1 mL ekstrak dimasukkan kedalam labu ukur berisi 4 mL air ditambahkan  $\text{NaNO}_2$  5% (0,3 mL), setelah 5 menit kemudian ditambahkan lagi 3 mL  $\text{AlCl}_3$  10% yang didiamkan selama 6 menit. Lalu ditambahkan  $\text{NaOH}$  1 M (2 mL). Absorbansi dibaca dengan spektroskopi UV-Vis pada 510 nm, kemudian didapatkan total flavonoid yang ditetapkan sebagai setara kuersetin (QE) (mg/g dari massa kering)

##### **Pengujian Aktivitas Antioksidan Menggunakan Metode ABTS Pembuatan larutan stok ABTS**

- a Larutan ABTS: Ditimbang sebanyak 38,4 mg ABTS kemudian dilarutkan kedalam aquades dalam labu ukur 1 mL sehingga konsentrasi menjadi 7 mM.
- b Larutan  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ : Ditimbang 14 mg kalium persulfat dilarutkan kedalam aquades dalam labu ukur 10 mL sehingga konsentrasi menjadi 2,45 mM.

- c Larutan stok ABTS: 5 mL larutan ABTS ditambahkan 5 mL larutan kalium persulfat, diinkubasi dalam ruang gelap pada suhu 22-24°C selama 12-16 jam sebelum digunakan, dihasilkan larutan stok ABTS dengan warna biru gelap.

#### **Pengukuran aktivitas antioksidan**

1 mL larutan kerja ditambahkan dengan 10 µL ekstrak sampel (Konsentrasi Terlarut Maksimum) kemudian dikocok selama 10 detik lalu diinkubasi pada suhu 30°C selama 4 menit. Kemudian absorbansi dari reaksi campuran tersebut diukur pada panjang gelombang 734 nm (larutan etanol 99% sebagai larutan blanko) dan menghasilkan nilai persen inhibisi dan nilai IC<sub>50</sub>.

$$\text{Persen Inhibisi (\%)} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

#### **Penentuan nilai IC<sub>50</sub> (*Inhibitory Concentration*)**

Konsentrasi sampel dan persen inhibisi diplot masing-masing pada sumbu x dan y pada persamaan regresi linear ( $Y = ax+b$ ). Persamaan tersebut digunakan untuk menentukan nilai IC<sub>50</sub>.