



Penentuan Kandungan Total Flavonoid dan Total Fenolat Ekstrak n-Heksana Akar, Batang, dan Daun Tumbuhan *Crotalaria retusa* L

Theodore Y. K. Lulan^{1*}, Adelina Dos Santos¹, Fidelis Nitti¹

¹Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Nusa Cendana, Kupang

*Corresponding author, email: theodore_lulan@staf.undana.ac.id

ABSTRACT

Research has been conducted with the aim of knowing secondary metabolite compounds, total flavonoid content and total phenolate content in n-hexane extracts of roots, stems, and leaves of *Crotalaria retusa* L. This research includes qualitative and quantitative testing. The results of the research on n-hexane extracts of roots, stems, and leaves of *C. retusa* plants contain flavonoid and phenolic secondary metabolite compounds. The total flavonoid content in the root, stem, and leaf extracts of *C. retusa* plants are respectively; 105, 282 $\pm$ 0, 376; 13,326 and 97.021 $\pm$ 0.100 mg QE/g, and the total phenolate content of roots, stems and leaves are respectively; 220.69 $\pm$ 0.464; 152.239 $\pm$ 0.066 and 107, 309 $\pm$ 0.066 mg GAE/g.

Keywords: *Crotalaria retusa* L., secondary metabolites, total flavonoids, total phenolics

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian dengan tujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder, kandungan total flavonoid dan kandungan total fenolat pada ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *Crotalaria retusa* L. Penelitian ini meliputi pengujian kualitatif dan kuantitatif. Hasil penelitian pada ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* mengandung golongan senyawa metabolit sekunder flavonoid dan fenolat. Kandungan total flavonoid pada ekstrak akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* secara berturut-turut yaitu; 105, 282 $\pm$ 0, 376; 13, 326 dan 97,021 $\pm$ 0,100 mg QE/g, dan kandungan total fenolat akar, batang dan daun secara berturut-turut yaitu; 220,69 $\pm$ 0,464; 152,239 $\pm$ 0,066 dan 107, 309 $\pm$ 0,066 mg GAE/g.

Kata kunci: *Crotalaria retusa* L., metabolit sekunder, flavonoid total, fenolat total

PENDAHULUAN

Indonesia memiliki kekayaan hayati yang melimpah, sekitar 30.000 jenis tumbuhan obat tumbuh di hutan tropis Indonesia. Dengan kekayaan flora tersebut, Indonesia memiliki potensi untuk mengembangkan produk herbal yang kualitasnya setara dengan obat modern. tercatat sekitar 1.200 spesies tumbuhan obat telah dimanfaatkan dan diteliti sebagai obat tradisional⁸. Namun, sumber daya alam (SDA) tersebut belum dimanfaatkan secara optimal bagi kepentingan masyarakat. Dunia mencatat tradisi herbal berkembang pesat di dunia timur. Jadi apabila digunakan langkah dan cara pengolahan yang benar dan tepat khasiat tumbuhan obat tetap unggul dan tidak akan berubah¹⁹.

Salah satu tumbuhan obat yang menjadi kekayaan hayati Indonesia adalah tumbuhan *Crotalaria retusa* L. Tumbuhan *C. retusa* merupakan salah satu tumbuhan yang dianggap sebagai tumbuhan liar karena dapat tumbuh diberbagai tempat, seperti dipinggir jalan. Namun tumbuhan ini telah banyak dimanfaatkan sebagai obat herbal untuk mengobati

berbagai jenis penyakit, dan dapat berperan sebagai antioksidan alami dalam menangkal radikal bebas¹⁴. tanaman *C. retusa* dipercaya dapat mengatasi demam, pilek, dan penyakit paru-paru¹⁷. Selain itu *C. retusa* dapat dimanfaatkan untuk mengobati masalah urinasi, sebagai obat cacing dari ekstrak daunnya, serta digunakan untuk mandi anak-anak agar mencegah infeksi kulit dan juga untuk mengobati sariawan (Fitmawati dan Juliantari, 2017).

Menurut hasil penelitian Rakesh¹⁴ yang mengesktrak daun *C. retusa* menggunakan metode *soxhlet* menyatakan bahwa ekstrak daun *C. retusa* mengandung glikosida, saponin, alkaloid dan sterol. Penelitian lain yang dilakukan oleh Nurrani, dkk¹³ yang melaporkan tentang kandungan bahan aktif tumbuhan yang berpotensi sebagai obat, salah satunya *C. retusa*, berdasarkan hasil uji dengan metode *Brine Shrimp Lethability Test* (BSLT), menunjukkan adanya kandungan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan steroid/triterpenoid yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antikanker dan antioksidan.

Senyawa metabolit sekunder yang penyebarannya sangat merata pada berbagai spesies tumbuhan antara lain fenolat dan flavonoid. Senyawa fenolat merupakan salah satu jenis senyawa polifenol alami yang terkandung dalam tumbuh-tumbuhan. Pada tumbuhan, senyawa fenolat dapat berupa fenol sederhana, antarquinon, asam fenolat, kumarin, lignin, dan tanin⁶. Selain senyawa fenolat, Senyawa golongan polifenol lain yang juga turut tergolong sebagai agen antioksidan yaitu senyawa golongan flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu golongan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman. Senyawa ini terdapat pada semua bagian tanaman termasuk daun, akar, kayu, kulit, bunga, buah, dan biji. Flavonoid mempunyai kemampuan sebagai penangkap radikal bebas dan menghambat oksidasi lipid^{2,18}.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder dan kandungan total Fenolat dan Flavonoid ekstrak n-Heksana tumbuhan *Crotalaria retusa* L. pada penelitian ini telah dilakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan beberapa tahapan diantaranya preparasi sampel, ekstraksi sampel, skrining fitokimia, dan penentuan kandungan total Fenolat dan kandungan total Flavonoid.

Preparasi Sampel

Secara umum penyiapan simplisia akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* dilakukan dengan beberapa tahapan dimulai dari sortasi basah dan pencucian, perajangan, dan pengeringan. Sortasi basah artinya membersihkan kotoran pada tumbuhan paska diambil dari habitatnya, dan dapat dilakukan dengan mencuci tanaman obat. Proses pencucian dilakukan sebanyak dua hingga tiga kali dengan menggunakan air bersih dan mengalir untuk

menghilangkan kotoran pada tumbuhan. Setelah dicuci tanaman obat dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dapat dilap menggunakan kain bersih ⁷.

Setelah bersih dan kering, tumbuhan akar, batang dan daun *C. retusa* dapat melalui proses perajangan. Proses ini dilakukan untuk mempermudah proses penggilingan menjadi serbuk dan mempermudah proses pengeringan lebih lanjut. Setelah melewati proses perajangan, sampel kemudian dikeringkan tanpa terkena sinar matahari secara langsung, hal ini karena suhu pengeringan yang tinggi seperti diatas 60°C dapat menyebabkan perubahan senyawa dalam tanaman termasuk senyawa flavonoid yang juga merupakan senyawa fenolik yang cenderung sensitif terhadap panas sehingga suhu yang tinggi dapat menyebabkan degradasi atau kerusakan pada struktur molekulnya.

Ekstraksi Sampel

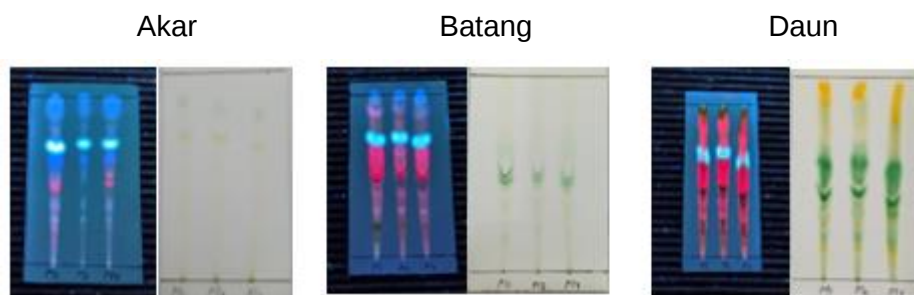
Sampel akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Pemilihan metode maserasi didasarkan pada kesederhanaan prosedur dan peralatan yang digunakan, tanpa memerlukan pemanasan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai dan tidak mengakibatkan degradasi zat aktif dalam sampel karena suhu tinggi dan kepekaan senyawa terhadap panas¹⁵. Proses Maserasi dilakukan dengan cara merendam sampel dalam pelarut selama 3 x 24 jam pada suhu ruangan dengan dua kali remaserasi atau pergantian pelarut yang baru. Tujuan untuk menarik kandungan senyawa yang masih tertinggal pada saat maserasi pertama dan untuk mengekstrak senyawa yang terdapat dalam sampel secara menyeluruh ²⁰ sementara itu waktu ekstraksi dilakukan selama tiga hari memungkinkan terjadinya kontak yang baik antara pelarut dengan sampel sehingga ekstraksinya berlangsung secara optimal ⁴. Hasil ekstraksi kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk memisahkan pelarut dari ekstrak. Sehingga diperoleh % rendemen ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* pada tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak n-Heksana *C. retusa*

Sampel	Berat (g)	Berat Ekstrak (g)	Rendemen (%)	Warna Ekstrak
Akar	100	0,1191	0,119	Hijau muda
Batang	150	0,1955	0,130	Hijau tua
Daun	200	0,5237	0,261	Hijau tua

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa rendemen hasil ekstraksi akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* menggunakan pelarut n-heksana tergolong sangat kecil yang menunjukkan bahwa rendahnya komponen aktif yang terdapat dalam ekstrak n-heksana. Rendahnya % rendemen menunjukkan bahwa ekstrak sampel akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* mengandung sedikit komponen non polar. Menurut Sayuti,¹⁴ ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi rendemen ekstrak, diantaranya asal sampel,

kondisi lingkungan, ukuran sampel, kondisi dan waktu penyimpanan sampel serta perbandingan sampel dengan pelarut yang digunakan. Selanjutnya dilakukan pemantauan KLT pada masing-masing ekstrak akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa*, yang dielusikan dengan n-heksana : etil asetat (7:3). Keduanya digunakan dalam penelitian ini karena selain mampu memberikan pemisahan yang baik, juga dapat memberikan pemisahan dengan banyak spot yang dapat terlihat pada lampu UV 366 nm.



Gambar 1. Hasil Pemantauan KLT.

Skrining fitokimia

Skrining fitokimia bertujuan untuk memberikan gambaran tentang kandungan senyawa metabolit sekunder pada ekstrak kental akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa*. Setelah dilakukan uji fitokimia, telah teridentifikasi bahwa ekstrak kental tumbuhan *C. retusa* positif mengandung metabolit sekunder flavonoid dan fenolat. Hasil uji fitokimia ekstrak n-heksana sampel akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak n-Heksana Tumbuhan *C. retusa*

Golongan Senyawa	Pereaksi	Perubahan warna/endapan	Hasil uji sampel		
			Akar	Batang	Daun
Alkaloid	Dragendrof	Endapan merah bata, merah, jingga	-	-	-
	Mayer	Endapan putih kekuningan	-	-	-
Flavonoid	HCl + Mg	Berwarna merah/jingga	+	+	+
Saponin	Air	Terdapat busa	-	-	-
Fenolat	FeCl ₃	Hitam pekat	+	+	+

Keterangan: (+) : mengandung golongan senyawa aktif

(-) : tidak mengandung golongan senyawa aktif

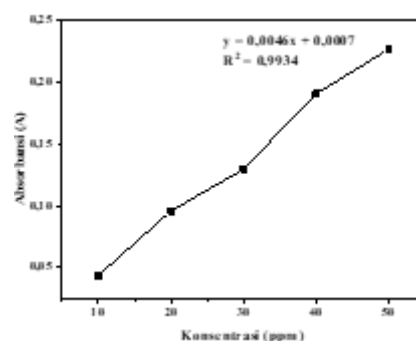
Hasil tabel 2 menunjukkan bahwa ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* positif mengandung senyawa flavonoid dan fenolat yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah dan hitam.

Proses identifikasi senyawa flavonoid melibatkan penambahan larutan HCl dan Mg untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur senyawa flavonoid. Perubahan warna menjadi merah atau jingga menandakan bahwa ekstrak positif mengandung senyawa flavonoid. Penambahan larutan HCl akan memicu reaksi reduksi-oksidasi antara magnesium sebagai agen oksidator dan senyawa flavonoid. Sedangkan untuk mengidentifikasi senyawa fenolik, digunakan larutan FeCl_3 . Ion Fe^{3+} akan bereaksi dengan gugus fenolik yang terdapat dalam sampel, menghasilkan warna hijau, biru, atau hitam pekat yang menunjukkan keberadaan senyawa fenolik dalam ekstrak sampel ¹².

Penentuan Kandungan Total Flavonoid

Pada penelitian ini untuk menentukan kandungan senyawa flavonoid total pada sampel akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* digunakan kuersetin sebagai larutan standar dengan konsentrasi 10; 20; 30; 40; dan 50 ppm. Kuersetin dipilih sebagai larutan standar dalam penentuan kandungan total flavonoid karena merupakan flavonoid golongan flavonol yang mempunyai gugus hidroksil C-3 dan C-5 yang berdekatan dengan flavon dan flavonol ². Penentuan panjang gelombang serapan maksimum pada baku standar kuersetin dengan konsentrasi 10 ppm pada menit ke-30 setelah penambahan reagen AlCl_3 dan CH_3COONa serta aquades menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan panjang gelombang serapan maksimum 435 nm. Hasil pengukuran absorbansi pada larutan baku standar kuersetin menggunakan panjang gelombang maksimum 435 nm dapat dilihat pada Gambar 2.

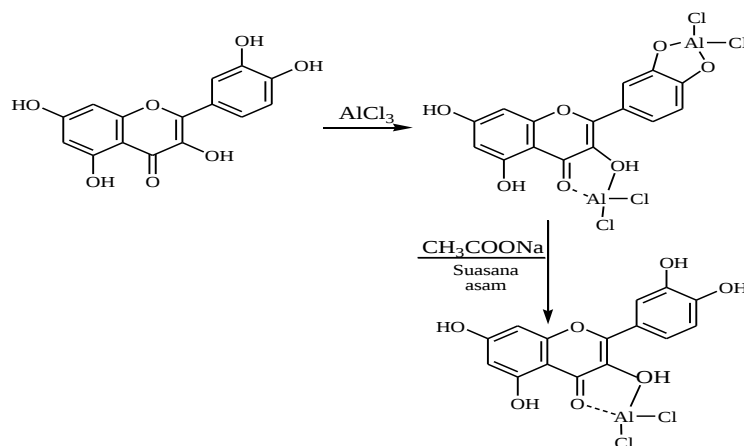
No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	10	0,044
2	20	0,096
3	30	0,130
4	40	0,191
5	50	0,227



Gambar 2. Absorbansi dan Kurva Kalibrasi larutan standar kuersetin

Penentuan kandungan total flavonoid menggunakan metode kolorimetri. Metode kolorimetri menggunakan penambahan pereaksi aluminium klorida (AlCl_3) dan natrium asetat (CH_3COONa). Larutan AlCl_3 digunakan dengan tujuan untuk membentuk kompleks berwarna dengan flavonoid sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah *visible* (tampak) ditandai dengan perubahan warna yang lebih kuning pada larutan uji. Penambahan

CH₃COONa berfungsi untuk menstabilkan dan mempertahankan panjang gelombang pada daerah *visible* (tampak) ³.



Gambar 3. Reaksi Flavonoid dengan AlCl₃.

Untuk menghitung jumlah total flavonoid dalam sampel uji, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 435 nm. Hasil pengukuran absorbansi sampel akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* dimasukkan ke dalam persamaan regresi linear $y = 0,0046x + 0,0007$, sehingga dapat diperoleh kandungan total flavonoid ekstrak n-heksana tumbuhan *C. retusa* yang dinyatakan dalam *quersetin equivalen* (mg/g massa kering) ¹⁰ seperti pada tabel 3.

Tabel. 3 Kandungan total flavonoid tumbuhan *C. retusa*

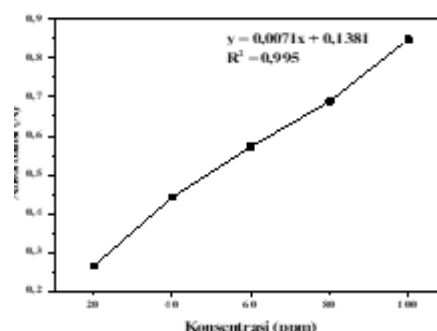
Sampel	Pengulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/mL)	Rata-rata (mg QE/g)
Akar	1	0,497	107,891	105,282 ± 0,270
	2	0,494	107,240	
	3	0,496	107,674	
	Rata-rata	0,495	105,282	
Batang	1	0,062	13,326	13, 326
	2	0,062	13,326	
	3	0,062	13,326	
	Rata-rata	0,062	13,326	
Daun	1	0,448	97,234	97,021 ± 0,100
	2	0,448	97,234	
	3	0,447	97,021	
	Rata-rata	0,447	97,021	

Berdasarkan tabel 3, dapat diketahui bahwa kandungan total flavonoid pada ekstrak n-heksana sampel akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* secara berturut-turut yaitu 105, 282 ± 0, 376; 13, 326 dan 97,021 ± 0,100 mg QE/g, dimana kandungan flavonoid tertinggi terdapat pada ekstrak n-heksana akar.

Penentuan Kandungan Total Fenolat

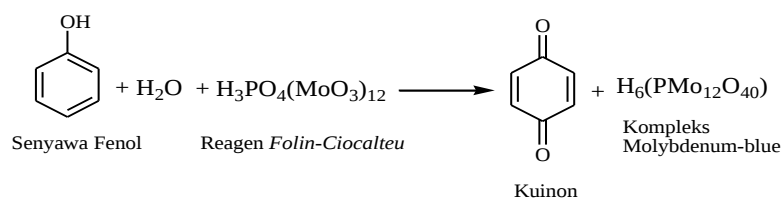
Pada penelitian ini untuk menentukan senyawa total fenolat pada sampel akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* digunakan asam galat sebagai larutan standar dengan konsentrasi 20; 40; 60; 80; dan 100 ppm. Asam galat digunakan sebagai larutan standar karena asam galat merupakan turunan dari hidrobenzoat yang adalah suatu asam fenol sederhana bersifat murni dan stabil. Asam galat termasuk dalam senyawa fenolik dan memiliki aktivitas antioksidan yang kuat ⁹. Penentuan panjang gelombang serapan maksimum pada baku standar asam galat dengan konsentrasi 20 ppm pada menit ke-120 setelah penambahan reagen *Folin-Ciocalteu* dan Na₂CO₃ serta aquades menggunakan spektrofotometer UV-Vis menghasilkan panjang gelombang serapan maksimum 758 nm. Hasil pengukuran absorbansi pada larutan baku asam galat menggunakan panjang gelombang maksimum 758 nm dapat dilihat pada tabel gambar 3.

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi
1	20	0,264
2	40	0,442
3	60	0,572
4	80	0,689
5	100	0,849



Gambar 3. Absorbansi dan kurva kalibrasi larutan standar asam galat.

Penentuan kandungan total fenolat dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan pereaksi *Folin-Ciocalteu*. Prinsip metode ini adalah terbentuknya kompleks berwarna biru sebagai hasil dari reaksi antara senyawa fenolik dengan *Folin-Ciocalteu*, yang dapat diukur pada panjang gelombang 758 nm. Pereaksi *Folin-Ciocalteu* mengoksidasi senyawa fenolik menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten berwarna biru, yang dapat dideteksi menggunakan spektrofotometer. Semakin tinggi konsentrasi senyawa fenolik, semakin banyak ion fenolat yang dapat mengoksidasi pereaksi *Folin-Ciocalteu* menjadi kompleks biru, sehingga warna biru yang dihasilkan menjadi lebih pekat. Suasana basa ini dapat dicapai dengan menambahkan Na₂CO₃ 10%. Reaksi antara fenolat dan reagen *Folin-Ciocalteu* dapat dilihat pada gambar 4.



Gambar 4. Reaksi Fenolat dengan Pereaksi *Folin-Ciocalteu*.

Kadar total fenol dihitung dengan menggantikan nilai absorbansi (y) dari larutan ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* pada panjang gelombang maksimum ke dalam persamaan regresi linear $y = ax + b$ yang didapat dari kurva kalibrasi asam galat, sehingga nilai konsentrasi fenol (x) dapat diperoleh.. Pengukuran konsentrasi total fenol dilakukan dengan mengulanginya sebanyak 3 kali dan diambil rata-ratanya. Kandungan total fenolat dalam ekstrak akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* dinyatakan dalam GAE (*gallic acid equivalent*) yaitu kesetaraan miligram asam galat dalam 1 g sampel 10. Hasil perhitungan kandungan total fenolat dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Kandungan total fenolat tumbuhan *C. retusa*

Sampel	Pengulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	Kandungan Total Fenolat (mg GAE/g)
Akar	1	1,710	221,394	220,69 ± 0,464
	2	1,705	220,690	
	3	1,702	220,267	
	Rata-rata	1,705	220,690	
Batang	1	1,220	152,380	152,239 ± 0,066
	2	1,219	152,239	
	3	1,219	152,239	
	Rata-rata	1,219	152,239	
Daun	1	0,901	107,450	107,309 ± 0,066
	2	0,900	107,309	
	3	0,900	107,309	
	Rata-rata	0,900	107,309	

Berdasarkan tabel diatas, dapat diketahui bahwa kadar total fenolat ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* secara berturut-turut adalah sebesar 220,69 ± 0,464; 152,239 ± 0,066 dan 107, 309 ± 0,066 mg GAE/g. Dimana kandungan total fenolat pada ekstrak akar lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak batang dan daun.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak n-heksana sampel akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* yaitu: flavonoid dan fenolat.
2. Kandungan total flavonoid dalam ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* secara berturut-turut yaitu sebesar 105, 282 $\pm$ 0, 376; 13, 326 dan 97,021 $\pm$ 0,100 mg QE/g.
3. Kandungan total fenolat dalam ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa* secara berturut-turut yaitu sebesar 220,69 $\pm$ 0,464; 152,239 $\pm$ 0,066 dan 107, 309 $\pm$ 0,066 mg GAE/g.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ahmad, R. A., Juwita., Ratulangi, D.A.S., dan Malik, A. 2015. Penetapan kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak metanol buah dan daun patikala (*Etlingera Elatior Jack*) R.M.SM) *Jurnal Penelitian Farmasi*. 2(1): 1-10.
2. Artanti, N., dan Banjarnahor, S. 2014. Antioxidant propeties of flavonoids. *Medical Journal Of Indonesia*. 23(4): 239-244.
3. Chang, C., Yang, M., Wen, H., Chern, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10(3): 178-182.
4. Engka, T., Runtuwene, M.R.J., Abidjulu, J. 2017. Penentuan kandungan total fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan dari kuso mafola (*Drynaria Quercifolia L.*) *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 6(1): 47-52.
5. Fitmawati, dan Juliantari, E. 2017. *Tanaman obat dari semak menjadi obat*. Universitas Riau: UR-Press.
6. Harborne, J. B. 1987, *Metode fitokimia penentuan cara modern menganalisis tumbuhan*, diterjemahan oleh kosasih padmata dan imam sudiro, Edisi 1:9-10, Institut Teknologi Bandung: Bandung.
7. Indartiyah, N., Siregar, I., dan Agustina, Y., D. 2011. *Pedoman teknologi penanganan pascapanen tanaman obat*. Jakarta: Kementerian Pertanian.
8. Khoirul., F. A. 2010. *Sapu bersih semua penyakit dengan ramuan tradisional*. Jakarta : Citra Media.
9. Lee, K.W., Kim, Y.J., Lee, H.J., Lee, C.Y. 2003. Covoia has more phenolic phytochemicals and a higher antioxidant capacity than teas and red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(3): 7292-7295.
10. Lulan, T. Y. K., Fatmawati, S., Santoso, M., Ersam, T. 2018. Antioxidant capacity of some selected medicinal plants in east Nusa Tenggara, Indonesia: the potential of *Sterculia quadrifida* R.Br. *Journal Radicals and Antioxidant*. 8(2): 96-101.
11. Lulan, T. Y. K., Fatmawati, S., Santoso, M., Ersam, T. 2018. Free radical scavenging activity of *Artocarpus champeden* extracts. *Research Article*. Universitas Teknologi Sepuluh November: Surabaya.
12. Mukhriani, M., Sugiarna, R., Farhan, N., Rusdi, M., Arsul, M. I. 2019. Kadar fenolik dan flavonoid total ekstrak etanol daun anggur (*Vitis vinifera L.*). *ad-Dawaa'Journal of Pharmaceutical Science*. 2(2): 95-102.
13. Nurrani, L., Kinho J., dan Tabbba. S. 2014. Kandungan bahan aktif dan toksisitas tumbuhan hutan asal sulawesi utara yang berpotensi sebagai obat. *Jurnal Penelitian Hasil Hutan*. 32(2): 123-138.

14. Rakesh, T. 2019. In-vitro screening for anthelmintic of *crotalaria retusa* on pheretima posthuma. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. 9(4): 340-343.
15. Sa'adah, H., dan Nurhasnawati, H., 2015. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbai bawang tiwai (*Eleutherine americana* Merr) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. 1(2):149-153.
16. Sayuti, M. 2017. Pengaruh perbedaan metode ekstraksi, bagian dan jenis pelarut terhadap rendemen dan aktifitas antioksidan bambu laut (*Isis hippuris*). *Technology Science and Engineering Journal*, 1(3): 166–174.
17. Sinan, K.I., Saftic, L., Persurich, Z., Pavelicb, S.K., Etienne, O.K., Picot-Allaind, M.C.N., Mahomoodallyd, M. F., dan Zengina, G. 2020. A comparative study of the chemical composition, biological and multivariate analysis of *crotalaria retusa* L. stem barks, fruits, and flowers obtained via different extraction protocols. *South African Journal of Botany*. 128(3): 101-108.
18. Trembl, J., dan Smejkal, K. 2016. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *reviews Journal in Food Science and Food Safety*. 15(4): 720-738.
19. Trubus. 2009. *Herbal indonesia berkhasiat*. Depok: PT Trubus Swadaya. Hal 72-78.
20. Wendersteyt, N.V., Wewengkang, D.S., Abdullah, S.S. 2021. Uji aktivitas antimikroba dari ekstrak dan fraksi ascidian *herdmania momus* dari perairan pulau bangka likupang terhadap pertumbuhan mikroba *staphylococcus aureus*, *salmonella typhimurium* dan *candida albicans*. *Journal Phamacon*. 10(1): 706-712

Metode Penelitian

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan April 2024 - Mei 2024 di Laboratorium Program Studi Kimia Fakultas Sains dan Teknik, Universitas Nusa Cendana Kupang.

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kromatografi lapis tipis, oven, blender, ayakan 80 mesh, neraca analitik, peralatan ekstraksi, tabung reaksi, rak tabung reaksi, pipet tetes, spatula, batang pengaduk, gelas kimia, labu ukur, cawan petri, penangas air, *rotary vacuum evaporator* inkubator, dan spektrofotometer UV-vis.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa*, n-heksana, metanol p.a, aquades, CH₃COONa 1 M, aluminium triklorida 10%, *folin-ciocalteau* 10%, pereaksi mayer, pereaksi dragendoff, logam magnesium, FeCl₃ 1%, HCl 2 M, HCl pekat, kuersetin, asam galat, natrium karbonat 10%, aluminium foil, dan plat KLT.

Prosedur kerja

1. Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini berupa akar batang dan daun tumbuhan *C. retusa* yang berasal dari Dusun Fulanmonu, Desa Umaklaran, Kecamatan Tasifeto Timur, Kabupaten Belu, NTT. Diambil Akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* kemudian dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci menggunakan air mengalir. Setelah dibersihkan sampel dipotong kecil-kecil dan dirajang untuk mempermudah proses pengeringan. Sampel akar, batang dan daun kemudian dikeringkan tanpa terkena cahaya matahari langsung. Sampel yang telah kering kemudian dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh hingga diperoleh serbuk halus

2. Ekstraksi Tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Sebanyak masing-masing 100 g akar, 150 g batang dan 200 g daun tumbuhan *C. retusa* diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut n-heksana sebanyak 1500 mL selama 3 x 24 jam. Diambil hasil ekstraknya setiap 24 jam sekali dan

diganti dengan pelarut yang baru, selanjutnya dilakukan pemantauan dengan KLT. Kemudian dilakukan penyaringan terhadap hasil ekstrak yang diperoleh untuk mendapatkan filtrat yang terpisah dari residunya. Filtrat yang diperoleh kemudian dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan *rotary vacum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak yang pekat. Selanjutnya dihitung rendemen dari setiap sampel dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

3. Skrining Fitokimia

a. Identifikasi alkaloid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* ditambahkan dalam 1 mL HCl 2 M dan 9 mL aquades, dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit kemudian didinginkan pada temperatur ruangan dan disaring. Filtrat yang diperoleh akan digunakan untuk uji alkaloid. Diambil sejumlah 2 tabung reaksi untuk masing-masing ekstrak akar, batang dan daun kemudian pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 2 tetes pereaksi mayer dan dragendorf. Hasil positif alkaloid akan ditunjukkan dengan terbentuknya endapan atau keruhan.

b. Identifikasi flavonoid

Sebanyak 0,5 gram ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* ditambahkan dengan 10 mL metanol, kemudian dilakukan pemanasan $\pm$ 5 menit dan ditambahkan dengan HCl pekat sebanyak 10 tetes dan 0,2 gram serbuk magnesium. Sehingga terbentuknya warna hitam kemerahan, kuning atau jingga menunjukkan hasil positif flavonoid.

c. Identifikasi saponin

Sebanyak 0,5 gram ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* dimasukan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan aquades yang sudah dipanaskan terlebih dahulu sebanyak 10 mL. Campuran kemudian dikocok selama 1 menit. Selanjutnya didiamkan selama 10 menit dan amati buih atau busa yang terbentuk yang menunjukkan hasil positif saponin.

d. Identifikasi Fenol

Sebanyak 0,5 gram ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* ditambahkan 3-4 tetes FeCl_3 1%, jika terjadi perubahan warna hitam kebiruan hingga hitam pekat menunjukkan adanya kandungan fenol.

4. Penentuan Kandungan Total Flavonoid Ekstrak n-Heksana Akar, Batang dan Daun Tumbuhan *C. retusa* L.

Penentuan kandungan total flavonoid dengan metode kolorimetri aluminium triklorida (AlCl_3) dengan kuarsetin (QE) sebagai standar (Ahmad dkk., 2015).

a. Pembuatan larutan standar Kuarsetin

Timbang sebanyak 10 mg baku standar kuarsetin dan dilarutkan dalam 10 mL, metanol untuk 1000 ppm. Dari larutan standar kuarsetin 1000 ppm, kemudian dipipet 5 mL dan dilarutkan dalam 50 mL metanol untuk 100 ppm, selanjutnya dibuat beberapa variasi konsentrasi 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm. Dari masing-masing konsentrasi larutan standar kuarsetin diambil sebanyak 1 mL, kemudian ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL AlCl_3 10%, 0,2 mL Natrium asetat 1 M dan dicukupkan dengan aquades sampai 10 mL. Kemudian diinkubasi selama 30 menit pada suhu kamar dan ukur absorbansinya pada spektrofotometri *UV-Visible* dengan panjang gelombang 431 nm.

b. Penentuan Kandungan Total Flavonoid

Sebanyak 10 mg ekstrak n-heksana akar, batang dan daun tumbuhan *C. retusa* dilarutkan dalam 10 mL metanol. Kemudian dari larutan tersebut diambil 1 mL ditambahkan 3 mL metanol, 0,2 mL AlCl_3 10% 0,2 mL Natrium asetat 1 M dan dicukupkan volumenya dengan aquades sampai 10 mL. Campuran larutan kemudian diinkubasi selama 30 menit pada tempat gelap dengan suasana suhu ruangan. Absorbansinya diukur pada spektrofotometri *UV-Visible* dengan panjang gelombang 431 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi. Kadar flavonoid dengan metode aluminium klorida dapat dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Kadar flavonoid total (mg QE/g)} = \frac{(C \times V \times fp)}{W}$$

Keterangan :

C: Konsentrasi flavonoid contoh yang dihitung dengan menggunakan kurva standar (mg/L)

fp: Nilai faktor pengenceran

V: Volume hasil ekstraksi (L)

W: Berat ekstrak (g).

5. Penentuan Kandungan Total Fenolat Ekstrak n-Heksana Akar, Batang dan Daun Tumbuhan *C. retusa*.

Penetapan kadar fenol total dengan metode kalorimetri *Folin-ciocalteu* dengan asam galat (GAE) sebagai standar (Ahmad dkk., 2015).

a. Pembuatan larutan standar asam galat

Larutan standar asam galat 1000 ppm dibuat dengan menimbang sebanyak 10 mg asam galat dan dilarutkan dengan metanol hingga volume 10 mL. Dari larutan stok 1000 ppm dipipet sebanyak 0,2; 0,4; 0,6; dan 1 mL untuk membuat variasi konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm. Kemudian diambil sebanyak 1 mL dari masing-masing konsentrasi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dan ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *Folin-ciocalteu* dikocok dan didiamkan selama 4-8 menit, kemudian ditambahkan 2 mL larutan Na_2CO_3 10% dan Tambahkan aquades hingga volume 10 mL dan didiamkan selama 2 jam pada suhu ruangan. Diukur absorbansi pada panjang gelombang maksimum 758 nm, dengan spektrofotometer UV-Vis, dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat ($\mu\text{g/mL}$) dengan absorbansi.

b. Penentuan kandungan Total Fenolat

Timbang sebanyak 10 mg ekstrak n-heksana akar, batang, dan daun tumbuhan *C. retusa*. Kemudian dilarutkan dalam 10 ml metanol. Selanjutnya diambil masing-masing sebanyak 1 mL dari larutan tersebut dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL, kemudian ditambahkan dengan 0,4 mL reagen *Folin-ciocalteu* dikocok dan didiamkan 4-8 menit, tambahkan 2 mL Na_2CO_3 10% kocok hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dikocok hingga homogen. kemudian, Larutan yang telah direaksikan tersebut diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan. ukur serapan pada panjang gelombang serapan maksimum 758 nm. Pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap analisis dan diperoleh nilai rata-rata absorbansi. Kadar fenol total dihitung dengan asam galat sebagai kurva baku, atau dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Kadar Fenol Total (mg GAE/g)} = \frac{C \times V \times fp}{W}$$

Keterangan:

C: Konsentrasi fenol contoh yang dihitung dengan menggunakan kurva standar (mg/L).

fp: Nilai faktor Pengenceran

V: Volume hasil ekstraksi (mL)

W: Berat Ekstrak (g).