



Penentuan Kandungan Triterpenoid dan Uji Aktivitas Antiksidan Ekstrak Metenol Tumbuhan *Crotalaria Retusa* L. menggunakan Metode 1,1-Difenil-2-Pikrirazil (DPPH)

Theodore Y.K. Lulan^{1*}, Marseliani Taneo¹, Sherlly M.F. Ledoh¹

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

*Corresponding author, email: heski2007@gmail.com

ABSTRACT

This research aims to determine the class of compounds contained in the methanol extract of *Crotalaria retusa* L. plants, determine the total triterpenoid content by UV-Vis spectrophotometric method and test antioxidant activity by 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) method. The results showed that the methanol extract of *Crotalaria retusa* L. contains several classes of compounds such as flavonoids, tannins and triterpenoids. The total triterpenoid content obtained was in the leaf sample of 40.736 ± 2.80 mg UAE/g extract, stem sample of 37.952 ± 1.93 mg UAE/g extract and root sample of 32.096 ± 1.93 mg UAE/g extract. The antioxidant activity of methanol extracts of *Crotalaria retusa* L. plants has an IC_{50} value for stem samples of 26.443 ppm and root samples of 4.615 ppm which are categorized as very strong antioxidants. Meanwhile, the leaf sample has an IC_{50} value of 78.964 ppm which is categorized as a strong antioxidant.

Keywords: *Crotalaria retusa* L., triterpenoids, antioxidants, DPPH.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L., menentukan kandungan total triterpenoid dengan metode spektrofotometri UV-Vis dan uji aktivitas antioksidan dengan metode 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L. mengandung beberapa golongan senyawa seperti flavonoid, tanin dan triterpenoid. Kandungan total triterpenoid yang diperoleh adalah pada sampel daun sebesar $40,736 \pm 2,80$ mg UAE/g ekstrak, sampel batang sebesar $37,952 \pm 1,93$ mg UAE/g ekstrak dan sampel akar sebesar $32,096 \pm 1,93$ mg UAE/g ekstrak. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L. memiliki nilai IC_{50} untuk sampel batang sebesar 26,443 ppm dan sampel akar sebesar 4,615 ppm yang dikategorikan antioksidan sangat kuat. Sedangkan, sampel daun memiliki nilai IC_{50} sebesar 78,964 ppm yang dikategorikan antioksidan kuat.

Kata kunci : *Crotalaria retusa* L., triterpenoid, antioksidan dan DPPH

PENDAHULUAN

Indonesia adalah negara kepulauan beriklim tropis yang memiliki kekhasan sumber daya hayati. Sumber daya hayati ini menjadi penunjang bagi kehidupan manusia apabila dapat dimanfaatkan dengan baik. Berbagai spesies tumbuhan yang ditemukan di Indonesia, 6.000 diantaranya dapat digunakan sebagai bahan pengobatan tradisional¹. Pemanfaatan tanaman herbal untuk pemeliharaan kesehatan saat ini sangat dibutuhkan dan perlu adanya pengembangan agar pemakaiannya tepat dan aman. Salah satu tumbuhan yang tumbuh dengan sangat baik di Indonesia, khususnya di Nusa Tenggara Timur (NTT) yang dapat digunakan sebagai obat tradisional adalah tumbuhan *Crotalaria retusa* L. atau lebih dikenal dengan nama Luhu/kacang setan.

Crotalaria retusa L. merupakan tumbuhan Asia tropis anggota tanaman polong-polongan yang biasanya digunakan sebagai tanaman penutup tanah, sebagai pakan ternak, sebagai pupuk hijau dan tentunya sebagai obat tradisional. Di berbagai negara semua bagian tumbuhan baik dari akar, batang, daun, bunga hingga biji *Crotalaria retusa* L. digunakan untuk pengobatan banyak penyakit. Tumbuhan ini digunakan untuk mengobati infeksi kulit dan bagian akar digunakan sebagai obat batuk darah². Daun dan bunga *Crotalaria retusa* L. dimanfaatkan untuk mengobati demam dan penyakit paru-paru³. Bubuk dari bijinya dimanfaatkan untuk mengobati penyakit kusta, perut kembung dan berkhasiat sebagai analgenik terhadap rasa sakit akibat sengatan kalajengking dan bisa ular⁴. *Crotalaria retusa* L. memiliki sifat farmakologis karena selain adanya aktivitas antioksidan, ditemukan juga aktivitas anti-proliferasi, anti-bakteri dan trombolitik⁵. Sifat farmakologis dari *Crotalaria retusa* L. disebabkan karena adanya beberapa senyawa metabolit sekunder, diantaranya adalah senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, triterpenoid dan senyawa fenolat⁶.

Selain antioksidan, senyawa aktif dalam tumbuhan yang memiliki peran penting untuk pemeliharaan kesehatan adalah senyawa triterpenoid. Salah satu bagian dari triterpenoid adalah asiaticosida yang memiliki fungsi untuk menguatkan sel-sel kulit, meningkatkan perbaikan kulit, menstimulasi sel darah dan sistem imun serta dapat bertindak sebagai antibiotik alami. Bagian lain dari triterpenoid yaitu brahmocida yang berperan untuk memperlancar aliran darah dan merupakan protein penting untuk sel otak⁷. Senyawa golongan triterpenoid juga menunjukkan aktivitas farmakologis yang signifikan, seperti anti-bakteri, anti-inflamasi, sebagai inhibisi terhadap sintesis kolesterol dan anti-kanker⁸.

Berbagai penelitian untuk mengetahui kandungan triterpenoid dan aktivitas antioksidan suatu bahan atau sampel telah banyak dilakukan sebelumnya dengan beragam metode. Salah satu metode yang dapat digunakan untuk mengetahui aktivitas antioksidan adalah metode 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH). 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH) merupakan senyawa radikal yang dapat digunakan sebagai indikator proses reduksi senyawa antioksidan⁹. Prinsip pengujian dari metode ini adalah dengan mereaksikan senyawa antioksidan dengan senyawa radikal bebas. Kelebihan dari metode ini adalah mudah diterapkan karena senyawa radikal yang digunakan bersifat lebih stabil dibandingkan dengan metode lainnya¹⁰.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Sampel *Crotalaria retusa* L. yang diperoleh, dicuci, dipisahkan tiap bagian dan dikeringkan. Proses pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kandungan kadar air dalam sampel dan memperlambat pertumbuhan organisme pada sampel agar kandungan senyawa tidak terdegradasi¹¹. Sampel juga tidak dikeringkan dibawah sinar matahari langsung agar senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel tidak mengalami kerusakan akibat panas sinar matahari. Untuk memperbesar luas permukaan dan mempermudah proses ekstraksi, maka sampel kering dipotong kecil-kecil dan diblender kemudian diayak untuk memperoleh ukuran partikel sampel yang sama, selain itu ukuran serbuk sampel sangat berpengaruh terhadap rendemen ekstrak yang diperoleh¹². Hasil preparasi sampel berupa serbuk halus seperti yang ditunjukkan pada gambar berikut.



(a)Serbuk daun (b)Serbuk batang (c)Serbuk akar
Gambar 1. Serbuk sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Ekstraksi

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Metode ini paling aman digunakan untuk ekstraksi sampel bahan alam karena metode ini tidak melalui proses pemanasan sehingga senyawa yang terkandung dalam sampel tidak rusak. Pelarut yang digunakan adalah pelarut metanol yang bersifat polar sehingga lebih mudah melarutkan senyawa aktif bahan alam dibandingkan dengan pelarut lain. Proses maserasi dilakukan selama 3x24 jam karena merupakan waktu paling efektif untuk menarik senyawa aktif yang ada dalam sampel. Maserat yang didapatkan kemudian akan disaring dan filtrat akan dipekatkan sedangkan residu akan kembali diekstrak dengan pelarut yang baru. Sampel ekstrak kental yang diperoleh kemudian ditimbang dan hasilnya dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Massa Maserat Sampel Tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Sampel	Maserat 1	Maserat 2	Maserat 3	Massa Total
	(gram)	(gram)	(gram)	(gram)
Daun	2,5	2,04	1,2	5,74
Batang	1,12	1,9	1,5	4,52
Akar	2,2	1,6	0,8	4,6

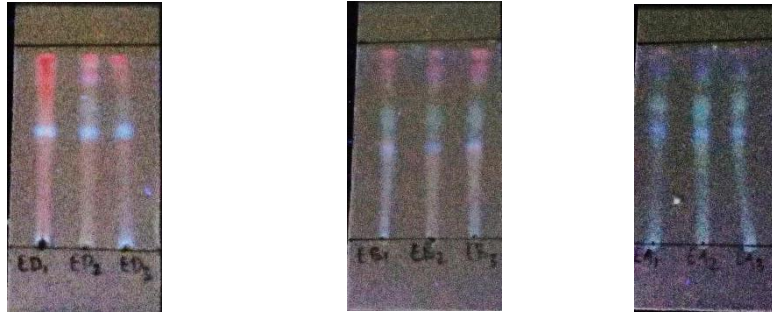
Dari data yang diperoleh dapat dilihat bahwa massa maserat hari pertama sampai hari ketiga mengalami penurunan, hal ini menandakan bahwa senyawa-senyawa aktif dalam sampel telah terekstrak dengan sangat baik.

Untuk mengetahui keefektifan proses ekstraksi suatu maka akan dihitung persen rendemen dari tiap sampel. Apabila rendemen yang diperoleh memiliki nilai yang besar maka komponen senyawa aktif yang terkandung dalam sampel juga memiliki jumlah yang besar, begitupun sebaliknya. Jumlah persen rendemen yang diperoleh dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 2. Total rendemen ekstrak sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Sampel	Serbuk Sampel	Ekstrak Kental	Rendemen
	(gram)	(gram)	(%)
Daun	422	5,74	1,4
Batang	300	4,52	1,5
Akar	211	4,6	2,2

Proses ekstraksi dilakukan pemantauan dengan KLT (Kromatografi Lapis Tipis). KLT dilakukan dengan dua jenis pelarut yang memiliki tingkat kepolaran berbeda, yaitu pelarut Etil Asetat yang bersifat semipolar dan pelarut *n*-heksana yang bersifat non-polar. Jenis pelarut yang digunakan diharapkan mampu mengangkat senyawa aktif yang terkandung dalam sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L. Hasil KLT dapat dilihat pada gambar berikut.



(a) Daun

(b) Batang

(c) Akar

Gambar 2. Profil KLT pada sinar UV 366 nm

Pengamatan titik noda plat KLT dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Titik noda pada plat terlihat sangat jelas dan terdapat pancaran sinar berwarna biru yang membuktikan bahwa fitokonstikuen yang terdapat dalam ekstrak sampel memiliki ikatan rangkap terkonjugasi sehingga menghasilkan pancaran sinar berwarna biru ketika dibawah sinar UV. Setelah pengamatan dibawah sinar UV, plat KLT kemudian dikeringkan dalam oven dan disemprot dengan H_2SO_4 10%. Hasilnya dapat dilihat pada gambar berikut.



(a) Daun

(b) Batang

(c) Akar

Gambar 3. Profil KLT setelah dioven

Warna yang diperoleh setelah proses pemanasan dan penyemprotan H_2SO_4 10% adalah warna kuning. Pereaksi H_2SO_4 berperan sebagai zat pereduksi yang merusak gugus kromofor dari komponen aktif dalam sampel sehingga dapat menampilkan noda yang dapat dilihat langsung oleh mata manusia¹³.

Uji skrining fitokimia

Uji fitokimia merupakan suatu metode yang dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel yang berguna untuk memberikan data kualitatif mengenai ada tidaknya suatu senyawa aktif dalam sampel bahan alam¹⁴. Hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada table berikut.

Tabel 3. Hasil uji skrining fitokimia sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Golongan Senyawa	Hasil Uji	Keterangan		
		Daun	Batang	Akar
Alkaloid	Penambahan pereaksi Mayer dan pereaksi Dragendroff = warna hijau tua	-	-	-
Flavonoid	Larutan berwarna jingga	+	+	+
Saponin	Tidak terbentuk busa dalam larutan	-	-	-
Tanin	Larutan berwarna hijau kehitaman	+	+	+
Triterpenoid	Terbentuk cincin berwarna coklat	+	+	+

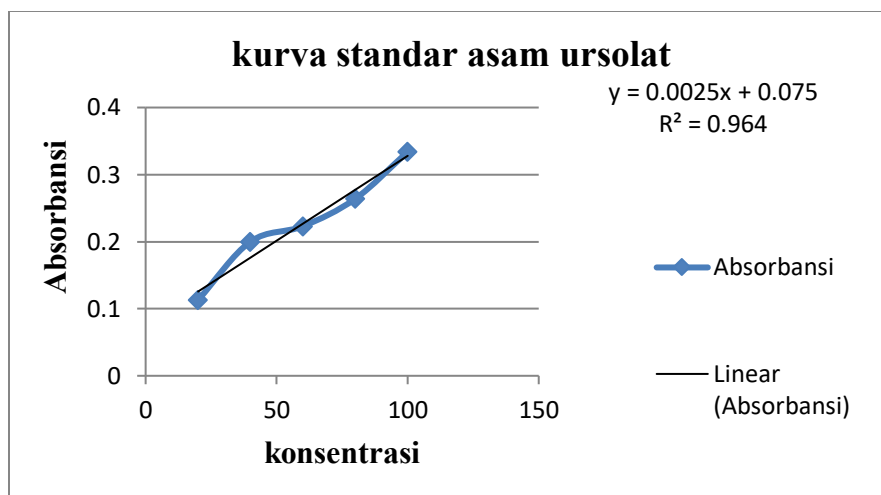
Berdasarkan tabel hasil uji skrining fitokimia diatas, dapat dilihat bahwa sampel positif mengandung senyawa flavonoid, tanin dan triterpenoid sedangkan tidak teridentifikasi adanya senyawa alkaloid dan saponin.

Penentuan Kandungan Total Triterpenoid

Metode yang digunakan adalah metode spektrofotometri. Digunakan juga asam ursolat yang berperan sebagai standar dalam pengujian ini. Asam ursolat digunakan sebagai standar karena merupakan triterpenoid pentasiklik sehingga berfungsi sebagai analog dari triterpen¹⁵.

Tabel 4. Nilai absorbansi standar asam ursolat

Konsentrasi µg/mL	Absorbansi (nm)
20	0,113
40	0,200
60	0,223
80	0,264
100	0,334



Gambar 4. Kurva standar asam ursolat

Tabel 5. Nilai kandungan total triterpenoid sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Sampel	Pengulangan	Absorbansi	Konsentrasi (mg/L)	TTC (mg UAE/g Ekstrak)
Ekstrak Daun	1	0,195	48	40,736 ± 2,80
	2	0,200	50	
	3	0,212	54,8	
	Rata-rata	0,2023	50,92	
Ekstrak Batang	1	0,188	45,2	37,952 ± 1,93
	2	0,193	47,2	
	3	0,200	50	
	Rata-rata	0,1936	47,44	
Ekstrak Akar	1	0,160	34	32,096 ± 4,44
	2	0,179	41,6	
	3	0,187	44,8	
	Rata-rata	0,1753	40,12	

Kurva standar asam ursolat yang digunakan sebagai standar dengan pengukuran dilakukan sebanyak 3 kali (triplo) lalu dihitung nilai rata-rata dan persamaan regresi yang diperoleh digunakan untuk menghitung total kandungan triterpenoid dari sampel.

Berdasarkan perhitungan rata-rata total kandungan triterpenoid pada tabel 5 diatas maka menunjukkan bahwa dalam setiap gram ekstrak metanol sampel daun, batang dan akar *Crotalaria retusa* L. masing-masing memiliki kandungan triterpenoid yang setara dengan 40,736 mg asam ursolat dalam daun, 37,952 mg asam ursolat dalam batang dan 32,096 mg asam ursolat dalam akar.

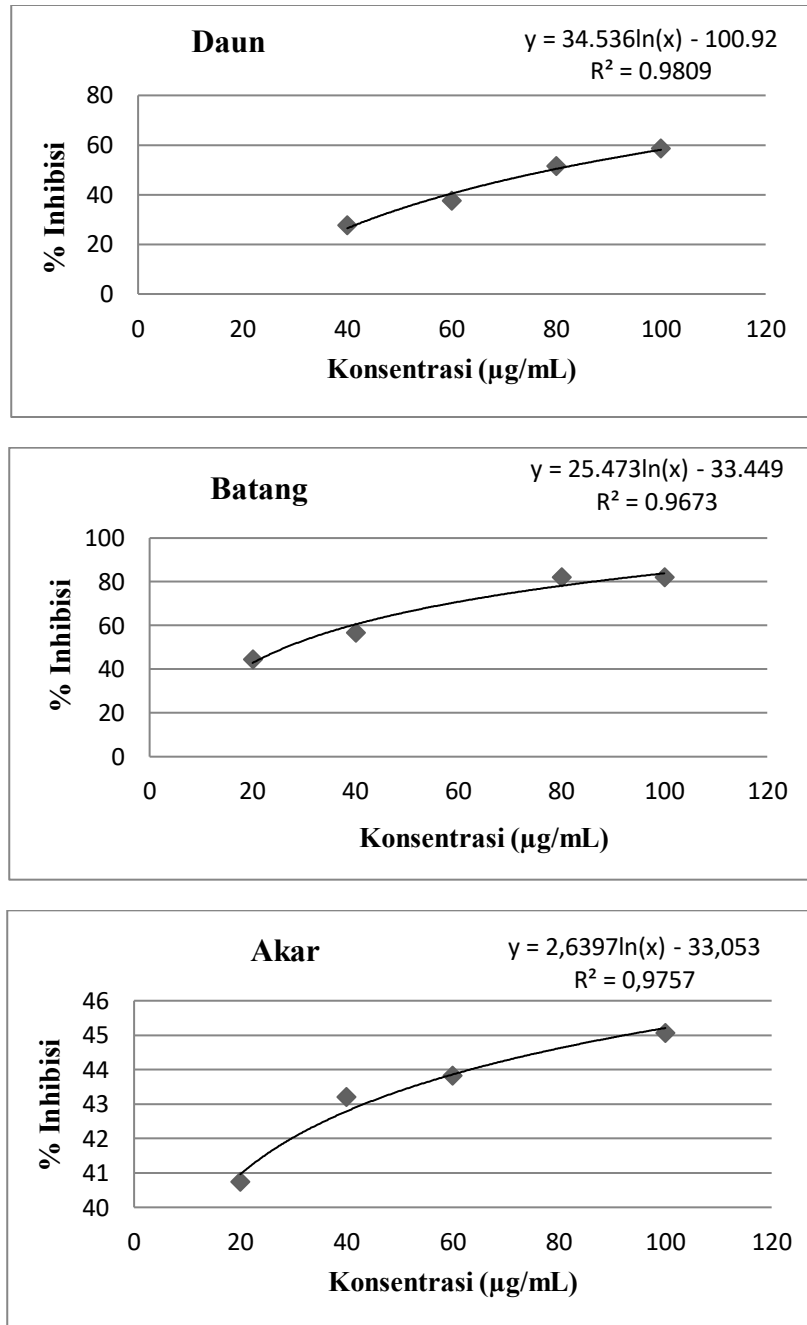
Uji Aktivitas Antioksidan

Uji ini memberikan atau menggambarkan aktivitas antioksidan dalam sampel dan menggunakan larutan DPPH sebagai senyawa radikal bebas. DPPH dibuat dengan mencampurkan serbuk DPPH dan ditambahkan dengan metanol sehingga menghasilkan larutan berwarna ungu. Hasil pengujian menunjukkan bahwa tumbuhan *Crotalaria retusa* L. memiliki senyawa antioksidan jika dilihat dari perubahan warna yang terjadi pada larutan. Nilai absorbansi yang diperoleh dari tiap konsentrasi sampel akan dihitung untuk memperoleh nilai % inhibisi. Hasil dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 6. Hasil pengujian aktivitas antioksidan sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Ekstrak Sampel	Konsentrasi	% Inhibisi
Daun	40	27,78
	60	37,67
	80	51,49
	100	58,55
Batang	20	44,44
	40	56,79
	80	82,09
	100	82,09
Akar	20	40,74
	40	43,20
	60	43,82
	100	45,06

Dari hasil yang telah didapat, maka nilai % inhibisi dan konsentrasi akan di plot untuk memperoleh nilai % peredaman yang digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀.



Gambar 5. Kurva hubungan konsentrasi sampel dan % inhibisi

Kemampuan aktivitas antioksidan dinyatakan dengan nilai IC_{50} yang merupakan bilangan yang menunjukkan konsentrasi sampel uji (µg/mL) yang memberikan peredaman DPPH sebesar 50% (mampu meredam proses oksidasi DPPH sebanyak 50%). Jumlah nilai IC_{50} pada tiap bagian sampel tumbuhan *Crotalaria retusa* L. dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 7. Nilai IC_{50} tumbuhan *Crotalaria retusa* L.

Sampel	Nilai IC_{50}	Kategori
Daun	78,964	Kuat

Batang	26,443	Sangat Kuat
Akar	4,615	Sangat Kuat

Nilai aktivitas antioksidan yang diperoleh yaitu sampel daun sebesar 78,964 ppm, sampel batang 26,443 ppm dan sampel akar 4,615 ppm. Sampel daun termasuk dalam kategori antioksidan kuat sedangkan sampel batang dan akar memiliki antioksidan sangat kuat. Kategori ini didasarkan pada spesifikasi suatu senyawa antioksidan dimana dikategorikan sangat kuat jika nilai IC_{50} kurang dari 50 ppm, dikategorikan kuat jika nilai berkisar antara 50-100 ppm, dikategorikan sedang jika nilai berkisar antara 100-150, dikategorikan lemah jika nilai berkisar antara 150-200 ppm dan dikategorikan sangat lemah jika nilai IC_{50} lebih dari 200 ppm namun masih berpotensi sebagai antioksidan¹⁶.

KESIMPULAN

Golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L. adalah flavonoid, tanin dan triterpenoid. Kandungan total triterpenoid yang terdapat dalam ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L. adalah sampel daun sebesar $40,736 \pm 2,80$ mg UAE/g ekstrak, sampel batang sebesar $37,952 \pm 1,93$ mg UAE/g ekstrak dan sampel akar sebesar $32,096 \pm 1,93$ mg UAE/g ekstrak. Ekstrak metanol tumbuhan *Crotalaria retusa* L. memiliki aktivitas antioksidan kategori kuat dan sangat kuat, dimana sampel batang dan akar memiliki antioksidan kategori sangat kuat dengan nilai IC_{50} untuk sampel batang sebesar 26,443 ppm dan untuk sampel akar sebesar 4,615 ppm sedangkan sampel daun memiliki antioksidan kategori kuat dengan nilai IC_{50} sebesar 78,964 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

1. Nurcahyani, O. 2014. Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Baru Laut (*Thespesia Populnea* L.) Solan Ex Correa) Pada Mus Musculus Terinfeksi Plasmodium Berghei dan Karakterisasi Hasil Isolasinya. *Skripsi*.
2. Wiedenfeld, H. 2011. Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids-toxicity and Problems. *Journal Food Addit Contamn*. 28(3): 282-292.
3. Nuhu H., Abdurraman, E and Shok, M. 2009. Ethnomedical Studies of *Crotalaria* Species Found in Zaria, Northem Nigeria. *Niger Journal Pharm Sci*. 8(2): 46-53.
4. Maregesi, M. S., Ngassapa, D. O., Pieters, L and Vlietinck, A. J. 2007. Ethnopharmacological Survey of the Bunda District, Tanzania: Plants Used to Treat Infectious Diseases. *Journal Ethno-pharmacology*. No. 113: 457-470.
5. Dhole, J., Dhole, N., Lone, K and Bodke, S. 2011. Preliminary Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Some Weeds Collected from Marathwada Region. *Journal Res Biol*. 1 (2): 19-23.
6. Sumi, F. A., Ansari, P., Azam, S., Nazneem, S., Suntana, M and Uddin, N. 2015. In-vitro Investigation of Anti-coagulation Property of Four Bangladeshi Plants of *Crotalaria* Species and Analysis of Their Qualitative Bioactive Compounds. *Journal Int Pharmacogn Phytochem Res*. 7(4): 740-744.
7. Soebagio, T. T., Hartini, Y. S dan Mursyanti, E. 2020. Aktivitas Antibakteri Sediaan Sabun Wajah Cair Ekstrak Herba Pegagan (*Centella asiatica* L.) Urban) Terhadap Pertumbuhan *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus aureus*. Biota: *Junal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. Vol.5 (2): 69-80.
8. Nassar, Z., Abdalrahim dan Amin, M. S. 2010. The Pharmacological Properties of Terpenoid from *Sandoricum koetjape*. *Journal Medcentral*. Vol. 1(1): 1-11.
9. Alam, Md. Nur, N. J. B., Md. Rafiquzzaman. 2013. Review on In Vivo And In Vitro Methods Evaluation of Antioxidant Activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. (21): 143-152.

10. Antari., Ni, M. R. O., Ni, M. W. Dan Sri, M. 2015. Pengaruh Ukuran Partikel Dan Lama Ekstraksi Terhadap Karakteristik Ekstrak Warna Alami Buah Pandan. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol.3. No.4. Hal: 30-40.
11. Tabun, Y. Y. F. 2022. Penentuan Kandungan Triterpenoid dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Nonpolar Ekstrak Kulit Batang *Sterculia feotida* L. Dengan Metode *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). *Skripsi*. Kupang: Universitas Nusa Cendana.
12. Sitorus, P., Supartiningsih., Jon, K. M dan Bernadetta, R. M. 2020. Isolasi dan Identifikasi Pektin dari Kulit Mas (*Musa acuminata* Colla). *Farmanesia*. 7(1): 25-30.
13. Ambarwati, N., Rakhmawati, R., Wahyuni, C. S. D. 2015. Uji Toksisitas Fraksi Daun Ambre (*Gerenium radula*) terhadap *Artemia Salina* dan Profol Kandungan Kimia Fraksi Teraktif. *Biofarmasi*. 13(1): 15-24
14. Kristanti, A. N., N. S. Aminah, M. Tanjung dan B. Kurniadi. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press. Hal. 23, 47.
15. Babaloba, Ibrahim T. 2013. Ubiquitos Ursolic Acid: A Potential Pentacyclic Triterpene Natural Product. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry ol.* 2(2).
16. Molyneux, P. 2004. The Use of Stabil Free Radical Diphenylpicrylhydrazil (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. *Journal of Science Tecnologi*. 26(2): 211-219..

METODOLOGI PENELITIAN

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun, batang, dan akar tumbuhan *Crotalaria retusa* L., metanol, metanol p.a, aquades, n-heksan, etil asetat, H₂SO₄ 10 %, H₂SO₄ pekat, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendroff, kloroform, FeCl₃ 1%, HCl 2 M, logam Mg, asam asetat anhidrat, vanillin, asam asetat glasial, asam perklorat 70%, asam ursolat, es batu, dan 1,1-Difenil-2-Pikrihidrazil (DPPH).

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, ayakan 60 mesh, bejana maserasi, timbangan portable, neraca analitik, batang pengaduk, plat KLT, pipa kapiler, cember, oven, corong, botol semprot, kertas saring, pipet tetes, pipet volume, botol reagen, peralatan gelas, labu ukur, cawan petri, kaca arloji, evaporator, penangas air, hot plate, termometer, aluminium foil, kertas label, dan spektrofotometer UV-Vis.

Tahapan Penelitian

Preparasi sampel

Tumbuhan *Crotalaria retusa* L. yang telah diperoleh kemudian dibersihkan dan dicuci menggunakan air mengalir. Selanjutnya bagian tumbuhan akan dipisahkan antara daun, batang dan akar lalu dikeringkan. Setelah kering, masing-masing bagian dipotong kecil-kecil dan dihaluskan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh. Serbuk sampel masing-masing bagian tumbuhan akan disimpan pada 3 wadah yang berbeda untuk masuk dalam tahap ekstraksi.

Ekstraksi

Sebanyak 500 gram serbuk sampel daun *Crotalaria retusa* L. diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol selama 3 x 24 jam. Hasil ekstrak akan diambil setiap 24 jam sekali dan dilakukan pemantauan dengan KLT. Setelah itu, dilakukan penyaringan terhadap hasil ekstrak. Filtrat yang diperoleh akan dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* yang bertujuan untuk memisahkan filtrat dengan pelarut agar mendapatkan hasil ekstrak yang pekat, sedangkan residu yang diperoleh akan diekstrak kembali menggunakan pelarut metanol yang baru. Selanjutnya ekstrak pekat akan ditimbang untuk menentukan persen rendemennya. Dibuat perlakuan yang sama untuk sampel batang dan akar *Crotalaria retusa* L. Persen rendemen dapat dihitung menggunakan rumus :

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

Uji skrining fitokimia

Identifikasi Alkaloid

Sebanyak 0,05 gram ekstrak sampel daun dilarutkan dengan 2 mL metanol dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2 mL HCl. Selanjutnya larutan dibagi ke dalam 2 tabung reaksi yang ditandai dengan tabung A dan tabung B. Pada tabung A ditambahkan dengan 3 tetes pereaksi Dragendroff sedangkan pada tabung B ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer. Jika terdapat endapan maka sampel positif mengandung Alkaloid. Dibat perlakuan serupa untuk ekstrak sampel batang dan akar.

Identifikasi Flavonoid

Sebanyak 0,05 gram ekstrak sampel daun dilarutkan dengan 2 mL metanol dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 0,5 gram logam Mg dan ditambahkan lagi dengan 4-5 tetes HCl. Jika larutan berubah warna menjadi merah, kuning atau jingga maka sampel positif mengandung flavonoid. Dibat perlakuan serupa untuk sampel ekstrak batang dan akar.

Identifikasi Saponin

Sebanyak 0,05 gram ekstrak sampel daun dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquades dengan perbandingan 1:1 dan dihomogenkan. Jika terdapat busa yang bertahan selama beberapa menit maka sampel positif mengandung saponin. Dibat perlakuan serupa untuk sampel ekstrak batang dan akar.

Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,05 gram ekstrak sampel daun dilarutkan dengan 2 mL metanol dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes FeCl_3 1%. Jika larutan berubah menjadi warna biru atau hijau kehitaman maka sampel positif mengandung tanin. Dibat perlakuan serupa untuk sampel ekstrak batang dan akar.

Identifikasi Steroid dan Triterpenoid

Sebanyak 0,05 gram ekstrak sampel daun dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat, lalu ditambahkan lagi dengan 1 mL H_2SO_4 . Jika terbentuk cincin berwarna cokelat maka sampel positif mengandung triterpenoid, akan tetapi jika larutan berubah warna menjadi hijau, biru atau ungu maka sampel positif mengandung steroid. Dibat perlakuan serupa untuk sampel ekstrak batang dan akar.

Penentuan kandungan total triterpenoid

- Pembuatan larutan stok asam ursolat 200 ppm
Ditimbang sebanyak 5 mg asam ursolat kemudian dilarutkan dengan metanol, lalu cukupkan volume larutan hingga 25 mL
- Pembuatan larutan standar asam ursolat
Dibat variasi konsentrasi 100, 80, 60, 40 dan 20 ppm dengan cara dipipet masing-masing konsentrasi yaitu 5, 4, 3, 2 dan 1 mL larutan stok dan dimasukkan dalam labu ukur 10 mL kemudian ditambahkan metanol sampai tanda batas.
- Pembuatan larutan untuk penentuan kurva standar
Diambil sebanyak 0,8 mL larutan standar asam ursolat dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan dalam tabung reaksi, lalu diuapkan dalam penangas air pada suhu 85°C . Kemudian ditambahkan dengan larutan campuran vanillin-asam asetat glasial sebanyak 0,4 mL lalu ditambahkan lagi 1 mL asam perklorat. Larutan lalu disimpan dalam penangas air dengan suhu 80°C selama 20 menit. Setelah itu, larutan didinginkan hingga mencapai suhu kamar dan ditambahkan 5 mL asam asetat glasial, dikocok selama 15-20 detik lalu didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Selanjutnya, digunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengukur absorbansi pada panjang gelombang ($\lambda = 531 \text{ nm}$). Nilai absorbansi yang diperoleh, digunakan untuk membuat kurva standar dan nilai persamaan regresi linear digunakan untuk menghitung kandungan total triterpenoid sampel.
- Penentuan kandungan total triterpenoid sampel uji

Dibuat larutan sampel konsentrasi 1000 ppm dengan cara ditimbang ekstrak sampel daun sebanyak 0,01 gram dan dilarutkan dengan metanol lalu cukupkan volume hingga 10 mL. Dari larutan sampel konsentrasi 1000 ppm, kemudian larutan sampel diencerkan menjadi 100 ppm dengan cara diambil 1 mL larutan sampel konsentrasi 1000 ppm yang telah dibuat sebelumnya kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan metanol sampai tanda batas.

Disiapkan 4 buah tabung reaksi, kemudian dimasukkan masing-masing sebanyak 0,8 mL larutan sampel dan diuapkan dalam penangas air pada suhu 85°C. Selanjutnya, masing-masing tabung ditambahkan sebanyak 0,4 mL larutan asam asetat glasial-vanillin dan ditambahkan lagi dengan 1 mL H₂SO₄ lalu dipanaskan selama 20 menit pada suhu 60°C. Setelah itu larutan didinginkan dalam wadah yang sudah berisi es batu dan dibiarkan sampai dingin. Larutan kemudian ditambahkan lagi dengan 5 mL asam asetat glasial lalu dikocok selama 15-20 detik dan didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Diukur absorbansinya pada panjang gelombang ($\lambda=531$ nm). Asam ursolat digunakan sebagai standar untuk membuat kurva kalibrasi dengan pengulangan sebanyak tiga kali (Liu, dkk., 2014). Dibuat perlakuan yang sama untuk ekstrak sampel batang dan akar.

Uji aktivitas antioksidan

1. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM
Ditimbang sebanyak 3,9 mg DPPH lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL, ditambahkan metanol p.a hingga tanda batas dan disimpan pada ruang gelap sebelum digunakan.
2. Penentuan panjang gelombang maksimum
Sebanyak 1 mL larutan DPPH 0,2 mM dipipet dan dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan 3 mL metanol p.a, dihomogenkan dan diinkubasi selama 30 menit pada ruang gelap. Kemudian diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada kisaran panjang gelombang 500-530.
3. Uji aktivitas ekstrak sampel *Crotalaria retusa* L.
Dibuat larutan srok ekstrak sampel 500 ppm dengan cara ditimbang sebanyak 5 mg ekstrak sampel daun dan dilarutkan dengan metanol p.a lalu cukupkan volume larutan hingga 10 mL, larutan kemudian dihomogenkan.
Selanjutnya dibuat variasi konsentrasi larutan menjadi 20, 40, 60, 80 dan 100 ppm dengan cara dipipet larutan induk berturut-turut 1, 2, 3, 4 dan 5 mL ke dalam labu ukur 10 mL dan ditambahkan dengan metanol p.a sampai tanda batas. Dari masing-masing variasi konsentrasi larutan, dipipet sebanyak 3 mL dan dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan 1 mL DPPH 0,2 mM, dihomogenkan dan diinkubasi pada ruang gelap selama 30 menit. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum dan pengujiannya dilakukan triplo. Dibuat perlakuan yang sama untuk sampel batang dan akar.

Nilai absorbansi tiap sampel akan dihitung presentase (%) inhibisinya. Penentuan persen pemerangkapan radikal bebas dihitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Absorbansi Blanko} - \text{Absorbansi Sampel}}{\text{Absorbansi Blanko}} \times 100\%$$

Konsentrasi sampel dan persen inhibisinya akan diplot masing-masing pada sumbu x dan y untuk memperoleh persamaan regresi linear $y = ax \pm b$ yang digunakan untuk menghitung nilai IC₅₀ dimana x merupakan konsentrasi larutan pembanding atau larutan uji dan y merupakan % IC₅₀.